

Lichtmikroskopische Untersuchungen an Lecithin-Wasser-Quellstrukturen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereich Physik
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfram Harbich
aus Helmstedt

Berlin 1984

Lichtmikroskopische Untersuchungen an Lecithin-Wasser-Quellstrukturen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereich Physik
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfram Harbich
aus Helmstedt

Berlin 1984

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Helfrich
2. Gutachter: Prof. Dr. D. Stehlik

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.1984

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
I. EINLEITUNG	4
II. PROBENPRÄPARATION	8
II.1 Allgemein übliche Verfahren	8
II.2 Hier verwendete Methoden	10
III. EXPERIMENTELLER AUFBAU	14
IV. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	20
V. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN UND MESSERGEBNISSE	29
V.1 Experimente an einzelnen Vesikeln	29
V.2 Experimente an ungeordneten Lecithinschichten	34
V.3 Phänomenologische Beschreibung der Quell- entwicklung von geordneten Lecithin- Vielschichtsystemen	41
V.3.1 Die Einleitung des Quellvorgangs	41
V.3.2 Die Unterbrechung des Quellvorgangs: durch Wasserentzug induzierte Struk- turänderungen	49
V.3.3 Die Fortsetzung der Quellentwicklung	57
V.3.4 Ergebnisse der Lecithindichte- Messung	62
V.3.5 Die Entstehung von Vesikeln	66
VI. DISKUSSION UND INTERPRETATION	73
VI.1 Die den Quellvorgang beeinflussenden Wechselwirkungen	73
VI.2 Energiebetrachtung zur Randbildung der L _α -Phase	79
VI.3 Faltung des Randes und Bildung von Äquidistanzstrukturen	84
VI.4 Analyse der Vesikelentstehung	86
VII. ZUSAMMENFASSUNG	91
LITERATURVERZEICHNIS	94

I. Einleitung

Lipide gehören mit zu jenen Stoffen, die maßgeblich am Aufbau der Primärstruktur von Membranen biologischer Zellkörper beteiligt sind. Obwohl diese Membranbildner untereinander in ihrem molekularen Aufbau beträchtliche Unterschiede aufweisen, besitzen sie sämtlich als gemeinsames Merkmal amphiphile Eigenschaften. Charakteristisch für amphiphile Stoffe ist deren dualer Molekülaufbau, der sich in eine hydrophobe und eine hydrophile Region gliedert. Im Falle des hier untersuchten Eilecithins (EL) wird der hydrophobe Teil von zwei Fettsäureresten und dem daran gebundenen Glycerin gebildet; der an das Glycerin gekoppelte hydrophile Teil besteht aus einem phosphorierten Alkohol, der in wässriger Umgebung ein Dipolmoment aufweist.

Als Folge des sogenannten "hydrophoben Effektes" /TAN80/ und der in Gegenwart polarer Medien auftretenden hydrophilen Wechselwirkung bildet hydratisiertes Lecithin je nach Wassergehalt und Temperatur eine Reihe lyotroper Phasen, deren unterschiedliche Strukturen durch Röntgenanalysen hinreichend klassifiziert werden konnten /CHA78/. Oberhalb einer gewissen Temperatur konstituiert sich die lamellare L_{α} -Phase, deren Struktur aus planaren, parallel geordneten und periodisch durch Wasserschichten voneinander separierten Lecithin-Doppelschichten gebildet wird. (Siehe Abb. 1) Da die Lecithinlamellen in der L_{α} -Phase fluide Eigenschaften besitzen, stellt ein derartiges Lecithin-Wasser-System im physikalischen Sinn einen flüssig-kristallinen Stoffzustand vom lyotrop-smektischen Typ dar /GEN74/.

Die flüssig-kristallinen Eigenschaften des Lecithins wurden zuerst von Lehmann erkannt /LEH11/. In seinen Untersuchungen stellte er fest, daß diese Substanz bei Wasserzugabe drastischen Gestaltveränderungen unterliegt und dabei Quellstrukturen ausbildet, deren Formen mit denen des zuvor von Virchow unter ähnlichen Bedingungen beobachteten Nervenmarks (Myelin) übereinstimmten /VIR1854/. Lehmann, der glaubte, in den

Myelinformen auch Abbilder biologischer Organismen entdeckt zu haben, schrieb seinerzeit: "Die Mannigfaltigkeit dieser Erscheinungen ist so groß, daß man einen von lebenden Mikroorganismen erfüllten Wassertropfen zu sehen glaubt, in welchem ein tolles Leben und Treiben herrscht, welches auf den sachkundigen Beobachter geradezu verblüffend wirkt."

Wenngleich die Bedeutung flüssiger Kristalle als Stoffkomponenten bei der Organisation komplexer biologischer Zellstrukturen seither immer mehr Beachtung gefunden hat /STE74, BOU78/ und Lipid-Doppelschichten längst anerkannte Modellsysteme für Plasmamembranen darstellen /BAN72, PAP73, BAN80/, bleibt doch das Urteil eines anderen sachkundigen Beobachters /FRE54/ ebenso gültig: "The myelin forms 'grow' at random and aimlessly in the substrate and the final outcome is a chaos rather than an illustration of organized life."



Abb. 1: Strukturmodell der L_{α} Phase

In der Tat ergeben sich aus dem sehr irregulär verlaufenden Quellvorgang des Lecithins große experimentelle Schwierigkeiten, wenn es um die Aufklärung der Strukturentwicklung der (meist multilamellaren) Myelinformen geht und Materialeigenschaften der Lecithinmembranen untersucht werden sollen. Nicht zuletzt deshalb werden entsprechende Messungen der Materialkonstanten bevorzugt an unilamellaren Membranen ausgeführt. Dennoch gibt es einige Versuche, auch durch das Studium der

Myelinformen zu quantitativen Ergebnissen zu gelangen. Experimente zur näherungsweisen Bestimmung der Krümmungselastizität von Eilecithinmembranen - ausgeführt an multilamellaren Lecithinzyllindern /SAK83/ - und theoretische Ansätze /SAU77/ zur Deutung der Stabilität derartiger, ihrer Struktur nach zu den weniger kompliziert gebaut zählenden Myelinformen können als Beispiele gelten.

Im Gegensatz zu den bisher bekannten Lecithin-Wasser-Quellexperimenten wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal der erfolgreiche Versuch unternommen, das erwähnte "Chaos" der während des Quellvorgangs des Lecithins in Wasserüberschuß entstehenden Strukturen einigermaßen zu verhindern und verschiedene Quellprozesse voneinander zu unterscheiden. Dies konnte hauptsächlich dadurch erreicht werden, daß die Einleitung der Quellentwicklung ausschließlich an planar orientierten Vielschichtsystemen geringer Dicke erfolgte. Dieses Verfahren erlaubt im wesentlichen eine sehr genaue Beobachtung der Bildungsmechanismen einzelner Quellstrukturen sowie deren Entwicklung im zeitlichen Verlauf des Quellvorgangs. Die Untersuchungen an solchen geordneten Lecithin-Wasser-Systemen ergaben als wichtigstes Ergebnis, daß der Abstand der Membranen während des Quellverlaufs stetig zunimmt und sich nicht - wie von Rand et al. /RAN81/ an Lecithin-Wasser-Dispersionen durch Röntgenstreuung bestimmt - auf einen Gleichgewichtsabstand einstellt.

Als Ursache für diese anscheinend unbeschränkte Vergrößerung des Membranabstands sind die von Helfrich /HEL78/ eingeführten Undulationskräfte in Betracht zu ziehen, die aufgrund thermisch angeregter Membranfluktuationen die anziehenden van der Waals-Kräfte überwinden können und dadurch bewirken, daß die Wasseraufnahme durch das Lecithin-Vielschichtsystem in weitaus stärkerem Maße erfolgt als dies bisher angenommen wurde. Anhand besonderer Quellstrukturen ist es gelungen, die zwischen den Membranen herrschenden abstoßenden Kräfte quantitativ zu ermitteln.

Hinweise zur Probenpräparation lassen sich dem II. Kapitel entnehmen. In Kapitel III. werden die verwendeten optischen Methoden und der Aufbau der Meßapparatur beschrieben.

Einige Erläuterungen zu den Grundlagen der für diese Arbeit relevanten theoretischen Aspekte sind in Kapitel IV. aufgeführt.

Das Kapitel V.1 enthält schließlich die Beschreibung der Versuche, die an den zur Bestimmung von Materialkonstanten des Lecithins offenbar geeignetsten Objekten, sog. Vesikeln, durchgeführt wurden. Diese, im Vergleich zu den Vielschicht-Myelinformen sehr einfach gebauten Strukturen - in sich geschlossene Membranen, durch deren Konfiguration das wässrige Medium in einen Innen- bzw. Außenraum separiert wird - konnten im elektrischen Feld zur Aufhebung ihrer topologischen Eigenschaft veranlaßt werden. Dieses Verfahren wurde verwendet, um die Energie freier Membranränder zu bestimmen.

In Kapitel V.2 werden einige Strukturen beschrieben, die bei Quellversuchen an ungeordneten Lecithinproben detektiert wurden. Diesen Beobachtungen zufolge scheint nicht ausgeschlossen zu sein, daß Membranen des EL unter bestimmten Bedingungen eine Tendenz zur Fusion aufweisen können.

Die Beschreibung der Quellstrukturen, anhand derer eine quantitative Methode zur Bestimmung der zwischen den Membranen herrschenden abstoßenden Kräfte entwickelt werden konnte, ist im Kapitel V.3 dargestellt. Eine Analyse dieser Quellstrukturen enthält das Kapitel VI.

In Kapitel VII. werden die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefaßt.

II. Probenpräparation

II.1 Allgemein übliche Verfahren

Die meisten der bisher bekannten Untersuchungen an Lecithin-Wasser-Systemen lassen sich hinsichtlich der zahlreichen Methoden zur Probenherstellung /SZO80/ grob in zwei Gruppen einteilen. Dazu seien exemplarisch einige Beispiele aufgeführt, die erkennen lassen, wie durch Handhabung verschiedenartiger Präparationsmethoden die Strukturentwicklung solcher Systeme beeinflusst werden kann.

Zur ersten Gruppe gehören Experimente mit der Zielsetzung, möglichst freie, geschlossene Membranen, sogenannte Vesikeln zu untersuchen. Bangham et al. publizierten als erste eine einfache Methode zur Herstellung von multilamellaren heterogenen Vesikeldispersionen, an denen sie die Diffusionsraten univalenter Ionen bestimmen konnten /BAN65/. Ihre Methode beruht auf der durch mechanische Beeinflussung (Druck, Schütteln der Probe) hervorgerufenen Zerstörung hydratisierter Lecithinschichten. Diese Schichten wurden zuvor durch Lösen des Lecithins in Chloroform und anschließender Verdampfung des Lösungsmittels unter Vakuum hergestellt. Durch Zugabe einer ausreichenden Wassermenge kann unabhängig von der Umwandlungstemperatur, die den Übergang von der kristallinen zur flüssig-kristallinen Phase regelt, ein Quellvorgang des Lecithins eingeleitet werden. Zur Vesikelbildung, die im allgemeinen spontan und unkontrolliert auftritt, kommt es jedoch nur, wenn sich das wasseraufnehmende Lecithin oberhalb der Hauptumwandlung, also im flüssig-kristallinen Zustand befindet. Eine mechanische erzeugte Zerstörung des quellenden Systems hat in den meisten Fällen die Bildung multilamellarer Vesikeln unterschiedlicher Größe (im μm -Bereich) zur Folge. Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Röntgenmessungen belegen, daß sich deren Strukturaufbau im wesentlichen aus konzentrisch angeordneten Membranen zusammensetzt /PAP67/. Mit Hilfe von Ultra-

schallbehandlung können derartige Strukturen weiter fragmentiert werden, so daß schließlich unilamellare Vesikeln der Größenordnung von ca. 300 Å entstehen /HUA69/.

Demgegenüber konnten Reeves und Dowben zeigen, daß gerade bei Vermeidung jeglicher äußeren Einwirkung auf das Lecithin-Wasser-System im Verlaufe des Quellvorgangs auch unilamellare Vesikeln gebildet werden, deren Durchmesser (1 - 50 µm) der Größenordnung nach mit den bis dahin bekannten multilamellaren Systemen vergleichbar waren /REE68/.

Da dieses Verfahren die Möglichkeit eröffnet, lichtmikroskopische Untersuchungen an unilamellaren, isolierten Vesikeln vorzunehmen, wurde es von uns dem Prinzip nach (zerstörungsfreies, ungehindertes Quellen) übernommen und den jeweiligen experimentellen Erfordernissen entsprechend weiterentwickelt.

Während bei den genannten Methoden der Wassergehalt der Proben immer größer als 99 vol.% ist, lassen sich der zweiten Gruppe jene Experimente zuordnen, die von vornherein den Wassergehalt auf weniger als 90 vol.% beschränken. In diesem Fall sind die untersuchten Proben der Struktur nach entweder nicht näher charakterisierte Multischichtdispersionen oder aber wohlorientierte smektische Kristalle mit einem Wassergehalt < 40 vol.% /POW75/. An beiden Systemen konnten mittels Röntgenbeugung entscheidende Beiträge zur Strukturanalyse von Lecithin-Doppelschichten gewonnen werden. Für die in dieser Arbeit interessierenden Fragen sind die Röntgenmessungen vor allem deshalb von Bedeutung, weil ihre bisherigen Ergebnisse zeigen, daß EL scheinbar nur im begrenzten Maße Wasser aufnehmen kann und demnach der Quellprozeß einer Beschränkung unterliegt. Dies wurde durch die Arbeiten von Small /SMA67/ und Le Neveu /NEV76, NEV77/ wiederholt festgestellt. Ihre Resultate ergeben übereinstimmend für EL eine Sättigung bei 44 vol.% H₂O. Die Separationsdicke der Wasserschicht beträgt für diesen Wert $d_w = 27.5 \text{ Å}$ und stellt den sogenannten Gleichgewichtsabstand

zwischen den einzelnen Lamellen dar. Bei diesem Abstand beträgt die Membranperiode $d = 63 \text{ \AA}$, die Doppelschicht ist demnach $35.5 \text{ \AA}$ dick.

Zur Herstellung dieser Proben wurde dehydriertes Lecithin zum Quellen in Wasser gegeben und anschließend durch Ultraschall dispergiert. Durch Zentrifugation konnte die Dispersion vom restlichen Wasser getrennt werden. - Ein anderes, häufig verwendetes Verfahren besteht darin, daß definierte Gewichtsanteile der beiden Stoffe durch Verrühren oder Ultraschallbehandlung ebenfalls zu einem Dispersionsgemisch verarbeitet werden.

II.2 Hier verwendete Methoden

Das zur Herstellung und Untersuchung von Vesikeln verwendete EL von Merck (Darmstadt) ist bereits im unvorbehandeltem Zustand schwach hydratisiert. Da es für eine Reihe von Versuchen nicht erforderlich war, den Wassergehalt des Lecithins vor dem Experiment zu kennen, konnte dabei auf die exakte Bestimmung des Hydratationsgrades verzichtet werden. Unter Bezugnahme auf eigene Eichmessungen (siehe Kap. V.3.4) kann davon ausgegangen werden, daß der Wasseranteil etwa 5 vol.% betrug. Das Lecithin besitzt dann gelartige Konsistenz und läßt sich daher ohne Verwendung von Lösungsmitteln in dünnen, relativ inhomogenen Schichten auf geeignete Probenhalter auftragen.

Als Probenträger wurden runde, $150 \text{ }\mu\text{m}$ dicke Deckgläser benutzt, die in konzentrischer Anordnung in ein Gewinde eingefaßt sind und den Boden der Probenkammer abschließen. Die Proben können, wenn nötig, vor dem Experiment extern in wassergesättigter Atmosphäre hydratisiert werden. Der obere Teil der Kammer wird ebenfalls durch ein eingefaßtes Deckglas verschlossen, wobei mit Hilfe der Gewindefassung eine variable Kammerhöhe bis zu $200 \text{ }\mu\text{m}$ eingestellt werden kann. Um Zirkularbewegungen der durchgehenden L_α -Phase zu vermeiden, ist bei

Untersuchungen an geordneten Vielschichtsystemen das obere Deckglas vor dem Experiment nicht fest mit der Fassung verbunden.

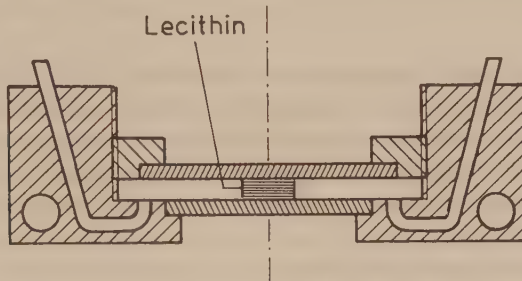


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Kammerkörpers

Der temperierbare Kammerkörper (siehe Abb. 2) besteht aus rostfreiem Stahl. Er ist um 180° drehbar in einer ebenfalls temperierbaren Fassung gelagert, die auf den Kreutztisch der Mikroskopapparatur montiert ist. Durch zwei sich gegenüberliegende Bohrungen mit 0.5 mm Durchmesser kann die Kammer nach Einschrauben der Probe vollständig mit Wasser gefüllt werden. Ebenso besteht die Möglichkeit, der Probe kontrolliert durch Verdunstung Wasser zu entziehen und damit eine Unterbrechung bzw. Umkehrung des Quellvorgangs zu bewirken.

Für die Herstellung von großen Vesikeln erwies es sich als vorteilhaft, hydratisiertes Lecithin in möglichst geringen Schichtdicken von etwa $1 - 5 \mu\text{m}$ aufzutragen. Für die dünnsten Schichten entspricht dies einem Stapel von etwa 200 Lamellen. Die Kammerhöhe war bei diesen Untersuchungen stets größer als die Probenschicht, so daß das quellende Lecithin vollständig von einer Wasserschicht bedeckt war.

Die Beobachtung zeigte, daß die Entstehung und Ablösung von unilamellaren Vesikeln gerade an inhomogenen Schichtstellen geringster Dicke bevorzugt auftrat. Durch Auftragen kleinster (kaum noch wägbare) Substanzmengen konnten so Proben hergestellt werden, bei denen die Vesikeldichte derart minimal war,

daß eine gegenseitige Störung derselben nicht auftreten konnte. Damit waren die experimentellen Voraussetzungen für die in Kap. V.1 beschriebenen Messungen an isolierten Vesikeln gegeben.

Dagegen war das Quellverhalten dickerer, ebenfalls inhomogener Schichten häufig von einer gitterartigen Vernetzung der Lamellen begleitet. Aus der Analyse dieser Strukturen konnten weitere Erkenntnisse über die Materialeigenschaften des EL abgeleitet werden. Dies wird in Kap. V.2 näher dargestellt.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen wurde wiederholt festgestellt, daß das EL bei längerer Quelldauer von mehreren Tagen die Tendenz aufweist, sich fortgesetzt in unilamellare Membranen vom kompakten Vielschichtsystem abzulösen, was als deutlicher erster Hinweis auf einen uneingeschränkten Quellprozeß gewertet wurde. Dieser sehr langsam verlaufende Vorgang steht damit in Gegensatz zu den oben erwähnten Ergebnissen der Röntgenmessungen, denen zufolge sich das Vielschichtsystem im Gleichgewicht mit dem freien Wasser befindet.

Zur Klärung dieses offensichtlichen Widerspruchs wurde in einer weiteren Reihe langwieriger Experimente der Versuch unternommen, den genauen Ablauf des Quellvorgangs zu studieren. Um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden deshalb die Untersuchungen an homeotrop orientierten Vielschichtsystemen ausgeführt.

Zur Herstellung dieser Proben diente EL von Serva (Heidelberg) mit einem angegebenen Reinheitsgrad von 97 - 99 %. In einer früheren Arbeit hatten Gulik-Krzywicki et al. mittels Röntgenstreuung nachgewiesen, daß bereits geringe Mengen (≈ 1 %) an geladenen Lipiden, die dem EL beigemischt waren, ausreichten, um den Abstand der Lamellen und damit die Wasseraufnahme des Lecithins entscheidend zu vergrößern /GUL69/. Um eine Beeinträchtigung des Quellverhaltens durch elektrostatische Effekte möglichst auszuschließen, wurden deshalb Kontrollmessungen an Proben durchgeführt, die zusätzlich durch mehrmalige Waschung

gen in einem Chloroform-Wasser-Gemisch von möglichen ionischen Verunreinigungen gesäubert wurden /MUE83/. Im Vergleich zu den unbehandelten Präparaten waren keine Veränderungen des Quellverhaltens feststellbar.

Das Lecithin wurde mit einem Hydratationsgrad von 10 - 20 vol.% in die Probenkammer gegeben. Es wurden damit etwa 10 % des Kammervolumens von oben bis unten ausgefüllt. Die Probendicke variierte von 5 - 110 μm und konnten mit Hilfe der mikroskopischen Einrichtung bis auf einen Fehler von $\pm 0.5 \mu\text{m}$ bestimmt werden. Die parallel zu den Glasbegrenzungen ausgerichtete Orientierung der Schichten wurde durch Pressen des sich zwischen den Kammergläsern befindlichen Materials erreicht. Die Dichte der bei diesem Verfahren unvermeidlich entstehenden Defekte ("ölige Streifen") ließ sich durch geeignete Wahl der Probenschichtdicke entscheidend vermindern. Systematische Voruntersuchungen ergaben - übereinstimmend mit den von Hentschel an Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) gemachten Beobachtungen /HEN81/ - daß sich nahezu defektfreie Proben bei sorgfältigster Präparation nur für Schichtdicken unterhalb von 30 μm herstellen lassen. In ihrer Grundstruktur sind die lamellaren Schichten planar, optisch anisotrop und uniaxial. Die Güte ihrer homeotropen Orientierung ließ sich daher durch Prüfung der Proben unter gekreuzten Polarisatoren feststellen. Als Ausgangssystem der in Kap. V.3 beschriebenen Quellstudien dienten ausschließlich defektfreie und wohlorientierte Bereiche des flüssigen Kristalls.

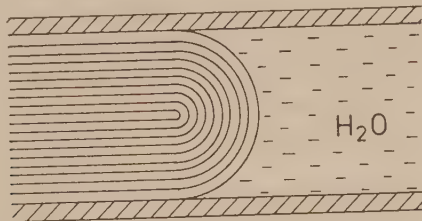


Abb. 3.: Ausgangssystem für Untersuchungen des Quellvorgangs an wohlgeordneten Lecithin-Wasser-Schichten

III. Experimenteller Aufbau

Zur Untersuchung der Proben diente ein Mikroskopaufbau, der sowohl im Durchlicht- wie im Auflichtverfahren betrieben werden konnte. Grundsätzlich war damit die Möglichkeit gegeben, Messungen an Proben durch abwechselnde Anwendung verschiedener optischer Methoden durchzuführen. Da Lecithinmembranen im optischen Sinne Phasenobjekte darstellen, wurde zur Sichtbarmachung der Quellstrukturen in erster Linie das im Durchlicht zu betreibende Phasenkontrastverfahren nach Zernike verwandt. Wie schon frühere Arbeiten gezeigt haben /HAR76, HAR77/ eignet sich diese Methode besonders gut zur Untersuchung von Vesikelstrukturen geringer Lamellarität; insbesondere konnte mittels Analyse der von solchen Strukturen erzeugten Kontraste deren Lamellenzahl direkt bestimmt werden /SER77/. Dadurch war experimentell die Möglichkeit vorhanden, gegebenenfalls eine Sonderung zwischen uni- und multilamellaren Systemen vorzunehmen.

Der Nachteil des Phasenkontrastverfahrens ist im Auftreten eines dieser Methode inhärenten Halo-Effektes begründet /BEY65/, der besonders - infolge von lokalen Variationen des Brechungsquotienten - bei der Untersuchung von multilamellar geordneten Systemen im Grenzbereich zur wässrigen Phase eine störende Überblendung verursacht, die das Erkennen von strukturellen Einzelheiten verhindert. Aus diesem Grunde wurde als ergänzende Methode das Dunkelfeldverfahren verwendet, das sich ebenfalls zur Untersuchung von Phasenobjekten eignet und eine bessere Beobachtung der für den Phasenkontrast kritischen Grenzflächen zuläßt. Neben diesen Methoden wurde zusätzlich die Polarisationsmikroskopie verwendet. Dies einerseits zwecks Analyse der Geometrie von lokalen Deorientierungen des Vielschichtsystems wie auch zur Strukturaufklärung von Defektmustern der wasserarmen L_{α} -Phase.

Anhand der nachfolgenden schematischen Darstellung sollen weitere Details des Mikroskopaufbaus erläutert werden.

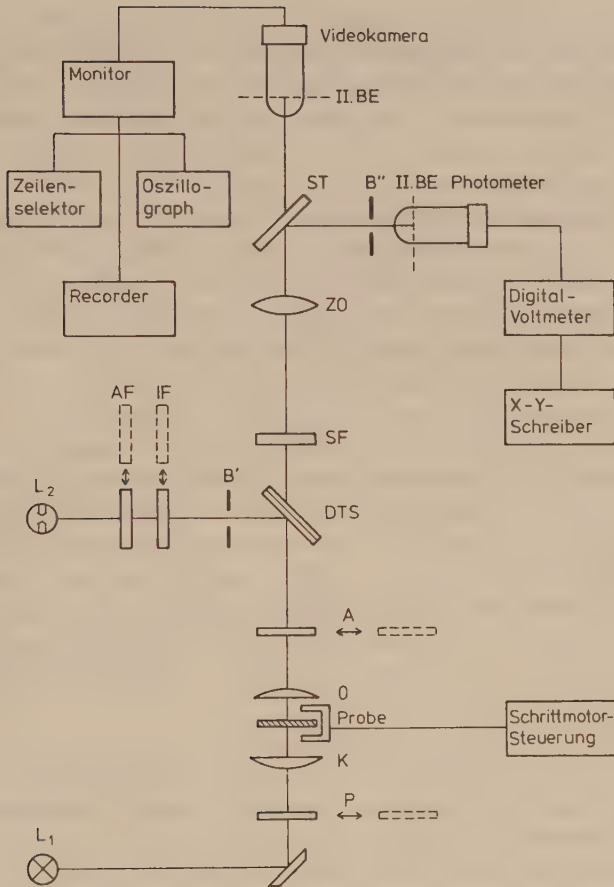


Abb. 4: Schematische Darstellung der Meßapparatur. Erklärung der Abkürzungen: A: Analysator, AF: Anregungsfilter, B', B'': Blendenregelung, II.BE: zweite Bildebene, DTS: Dichromatischer Teilerspiegel, IF: Interferenzverlaufsfilter, K: Kondensor, L₁: 100 Watt-Glühlampe, L₂: 200 Watt Hg-Höchststdrucklampe, O: Objektiv, P: Polarisator, SF: Sperrfilter, ST: Strahlenteiler, ZO: Zoom-Objektiv. Weitere Erläuterungen im Text.

Außer der gewöhnlichen mikroskopischen Abbildung der Proben und deren Beobachtung durch ein Binokular werden in einer zweiten Bildebene mit Hilfe eines stufenlos regelbaren Zoom-Objektivs (ZO) und des Strahlenteilers ST weitere Objektabbil-

dungen erzeugt. Eine auf die zweite Bildebene justierte Videokamera überträgt die Bildsignale auf einen Monitor (625 Zeilen, 50 Hz), von dem die Bildwiedergabe durch einen Recorder gespeichert werden kann. Die Auswertung der lateralen Geometrie von Objektstrukturen erfolgt durch einen Zeilenselektor, der durch Signalabtastung definiert einstellbarer Zeilen den Intensitätsverlauf des Objektes an den gewünschten Meßstellen aufnimmt und zur Wiedergabe auf einen Speicheroszillographen überträgt. Unabhängig von der Zeilenwahl läßt sich eine optimale Meßeinstellung durch die Schrittmotor-Steuerung des Kreuzzisches sowie eine senkrecht zur optischen Achse möglichen Drehwinkeljustierung der Probe erreichen.

Die Zeitauflösung pro Zeilendurchlauf beträgt $6.4 \cdot 10^{-5}$ sec. Unter Voraussetzung entsprechender Vergrößerungsstufen lassen sich damit die bei Undulationen ($\ll 50$ Hz) einzelner Lamellen im μm -Bereich auftretenden Amplitudenänderungen bequem detektieren. Die meisten Untersuchungen wurden an relativ kontrastreichen und bewegungsarmen Strukturen durchgeführt. Deshalb genügte häufig eine Mittelung der Kontrastfunktionen über 10 Abastereignisse, um eine ausgezeichnete Rauschunterdrückung zu erzielen.

Messungen der Lecithindichte von Multischichtsystemen konnten mit Verzicht auf entsprechende Label mit einer Fluoreszenzeinrichtung durchgeführt werden, da die ungesättigten CH_2 -Bindungen der Kettenregion des EL-Moleküls zur Emission angeregt werden können. Dies geschieht durch eine Auflichtanregung; dabei wird der Beleuchtungsstrahlengang durch das als Kondensor wirkende Objektiv geführt. Für die Abbildung von schwach fluoreszierenden Strukturen ist diese Art der Anregung von Vorteil, da die Intensität der Emission mit steigender Objektivapertur zunimmt. Für die Messungen wurde eine Objektiv mit Apertur 0.76 benutzt.

Als Lichtquelle dient eine 200 W Hg-Höchstdrucklampe. Die Anregung erfolgt im UV + Violett-Bereich über ein Bandpassfilter bei 355 - 425 nm. Die Erregerstrahlung wird über den dichro-

matischen Teilerspiegel DTS zum Objekt reflektiert. Das von der Probe emittierte Licht passiert das Sperrfilter SF (Langpassfilter mit Kantenwellenlänge 460 nm) in Richtung Strahlenteiler, wo die Ablenkung zum Photometer erfolgt.

Die Auswahl und Einstellung der Meßstellen geschieht mittels Phasenkontrastbetrachtung, um das durch die Anregungsstrahlung verursachte Ausbleichen des Lecithins auszuschließen. Die Beeinträchtigung kann während der Messung unterdrückt werden, indem Blende B' den Meßbereich auf 10 μm Durchmesser beschränkt und die Probe mit hinreichender Geschwindigkeit ($\approx 10 \mu\text{m s}^{-1}$) durch das Anregungsgebiet gesteuert wird. Die photometrische Messung erfolgt dann über eine weitere, in der zweiten Bildebene angebrachten Blende B", die bei vorgegebener Vergrößerungsstufe auf einen Bildausschnitt von 5 μm Durchmesser eingestellt ist.

Gemessen wurde ausschließlich an orientierten Probenstellen, um eventuelle Verfälschungen der Resultate durch die bei ungeordneten Systemen auftretende Anisotropie der Emission zu vermeiden.

Da die gemessenen Intensitäten zur Auswertung auf die Probenhöhen zu beziehen sind, muß diese Größe sehr genau bekannt sein. Voruntersuchungen ergaben, daß die Verwendung von "spacern" zu unvermeidbaren Ungenauigkeiten mit Meßfehlern $\gtrsim 20\%$ führte. Eine wesentliche Verbesserung konnte durch Anwendung einer Interferenzmethode erzielt werden, die für jeweils verschiedene Probenbereiche die direkte Bestimmung der Höhe gestattet. Die Interferenzen entstehen hier - bei senkrechter Inzidenz - durch Reflexion des einfallenden Lichtes an den Grenzflächen der zum Kammerinneren ausgerichteten Glasseiten sowie an den sich in deren unmittelbarer Nachbarschaft (oder in Kontakt mit dem Glas) befindlichen Lecithinmembranen. Es ergeben sich so für hinreichend große Vesikeln Interferenzmuster nach Art der Newton'schen Ringe, die dementsprechend

quantitativ ausgewertet werden können. Abb. 5 zeigt die Interferenzringe einer unilamellaren Vesikel, die sich in Kontakt mit dem Glas befindet.

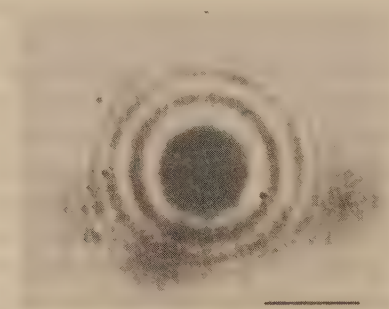


Abb. 5: Interferenzringe einer unilamellaren Vesikel, hervorgerufen durch den Membran-Glas-Kontakt. In diesem Fall ist die Vesikel zwischen den beiden Glasseiten der Probenkammer eingeklemmt. Ihr Durchmesser beträgt in der Kammermitte ca. 48 μm . Maßstab: 5 μm .

Die 0. Ordnung stellt den Membran-Glas-Kontaktbereich dar. Durch Focussierung auf die jeweils an der oberen und unteren Kammergrenzfläche auftretenden Interferenzen läßt sich die dadurch lokal definierte Probenhöhe D bei Berücksichtigung des Brechungsindex von Wasser ($n = 1,33$) mit einem Fehler $\lesssim 5\%$ bestimmen.

Die Interferenzen sind normalerweise sehr schwach ausgeprägt und lassen sich in der direkten Beobachtung kaum nachweisen, da die Intensitätsschwankungen der Ringstruktur von der aus dem Präparat stammenden Streustrahlung stark überlagert werden. Eine weitgehende Ausschaltung der störenden Streuung läßt sich durch die Blendenregelung sowie einer Ausschnittsvergrößerung des betreffenden Beobachtungsbereichs erzielen. Erst durch eine zusätzliche Monitor-Kontrastverstärkung (video-enhanced microscopy) werden die Interferenzmuster schließlich deutlich und gut sichtbar.

Um eine ausreichende Intensität in der Objektebene zu erzielen, ist es für den hier beschriebenen Aufbau notwendig, das Anregungsfilter AF aus dem Strahlengang zu entfernen. Die Messungen werden an einem Reflexions-Kurzpassfilter mit 510 nm Kantenlänge durchgeführt. Als Sperrfilter dient ein 515 nm Langpassfilter. Die Wellenlänge des zur Interferenz gelangenden Lichtes kann zusätzlich durch das InterferenzverlaufsfILTER IF kontrolliert werden. Zur qualitativen Auswertung wurde eine mittlere Wellenlänge von $\lambda = 565$ nm angenommen.

Neben der beschriebenen Anwendung zur Kammerhöhenmessung bietet die Grenzflächeninterferenzmethode weitere Möglichkeiten, einige Eigenschaften des Lecithin-Wasser-Systems zu charakterisieren: Wie der Abb. 5 zu entnehmen ist, kann durch Auswertung der Interferenzordnungen eine Aussage über die geometrische Beschaffenheit von begrenzten, aber - weil in Wechselwirkung mit dem Glas stehend - signifikanten Membranbereichen getroffen werden. Die Information über die Geometrie (von Membrankrümmungen, die auflösbare Interferenzen erzeugen) geht verloren, sobald hinreichend starke Membranfluktuationen auftreten. Für diesen Fall tritt an Stelle der 0. Ordnung ein Interferenzrauschen auf, daß als Maß für die Fluktuationsstärke gelten kann. Nicht zuletzt deshalb liefert diese Methode für Untersuchungen an Vielschichtsystemen wertvolle Hinweise auf das Fluktuationsverhalten von Probenbereichen, die sich hinsichtlich ihrer Lecithindichte unterscheiden. Die Beobachtung, daß Vesikeln, die ansonsten keiner Ortseinschränkung unterliegen, an der Glasgrenzfläche haften, deutet auf die Existenz einer anziehenden van der Waals-Wechselwirkung zwischen Glas und Lecithinmembran hin. Es kann sich hierbei jedoch nur um gespannte Vesikeln handeln. Normalerweise haften sichtbare Vesikeln nicht am Glas. Der Nachweis dieses mit anderen hier aufgeführten Methoden nicht detektierbaren Effektes ist oft unerläßlich für Experimente, in denen die durch thermische Anregung erzeugten Membranfluktuationen quantitativ untersucht werden. Einige Beispiele für Zylinderstrukturen, die am Glas haften, sind in Kapitel V.3.5 dargestellt.

IV. Theoretische Grundlagen

Der theoretischen Beschreibung der krümmungselastischen Eigenschaften von Lecithin-Doppelschichten, die von Helfrich /HEL73/ im Rahmen einer Kontinuumstheorie entwickelt worden ist, liegen folgende Annahmen zugrunde, die den physikalischen Zustand der Membranen idealisiert charakterisieren.

- i) Die Doppelschichten befinden sich im fluiden Zustand.
- ii) Auf die Membranen sollen keine äußeren Kräfte wirken, d.h. daß ihre laterale Spannung im Normalzustand Null ist.
- iii) Die beiden Seiten der Membran können verschieden sein, was im allgemeinen eine Tendenz zur spontanen Krümmung bedeutet.
- iv) Es wird angenommen, daß die Membran in ihrer Ebene isotrop ist, insbesondere daß die Moleküle keine kollektive Kippung relativ zur Schichtnormalen aufweisen.
- v) Zwischen den die Doppelschicht konstituierenden Monoschichten besteht keine Kopplung, d.h. sie können übereinander gleiten.

Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen soll hier der Deformationstyp der Membrankrümmung erläutert werden, da die Analyse der in dieser Arbeit aufgeführten Experimente weitgehend in Bezug zu den krümmungselastischen Eigenschaften von Lipid-Doppelschichten erfolgt. Im Gegensatz zur Behandlung der Dehnungsdeformation wird dabei eine weitere Idealisierung vereinbart, die die Membrandicke als infinitesimal ansieht, womit das Problem auf die Beschreibung einer "echten zweidimensionalen" Flüssigkeit reduziert wird.

Die mathematische Formulierung der Deformation erfolgt mit Hilfe eines parallel zur Schichtnormalen stehenden Einheitsvektors $\vec{n} = (n_x, n_y)$, dessen Orientierungsänderungen durch lo-

kale cartesische Koordinaten angegeben wird. Die Ableitungen des Direktors n_{xx} , n_{yy} und $n_{xy} = n_{yx}$ bilden einen Krümmungstensor, aus dem die Invarianten gebildet werden, welche die Deformation koordinatenunabhängig beschreiben. Die Krümmungselastische Energie läßt sich in Analogie zum Hooke'schen Gesetz als Funktion der linearen und quadratischen Invarianten ausdrücken. Man erhält so für die Flächendichte der freien Energie den Ausdruck

$$g_c = \frac{1}{2} \kappa (n_{xx} + n_{yy})^2 + \kappa' (n_{xx} + n_{yy}) + \bar{\kappa} (n_{xx} n_{yy} - n_{xy}^2) \quad (1)$$

Indem die zueinander orthogonalen Achsen der kleinsten und größten Krümmung als neue Bezugskordinaten gewählt werden, läßt sich diese Gleichung in Hauptachsendarstellung angeben. Für diesen Fall gilt $n_{xy} = n_{yx} = 0$. In der Helfrich'schen Formulierung ist der lineare κ' -Term in dem von ihm eingeführten phänomenologischen Parameter, der spontanen Krümmung c_0 enthalten: Mit den Hauptkrümmungen $n_{xx} = c_1$ und $n_{yy} = c_2$ ergibt sich dann als Ausdruck für die Energiedichte

$$g_c = \frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{\kappa} c_1 c_2 \quad (2)$$

Die spontane Krümmung c_0 berücksichtigt eine mögliche Doppelschicht-Asymmetrie, die - bei sonstiger Gleichheit der Monoschichten - auch chemisch induziert werden kann. Wegen der Isotropie der Membran besitzt c_0 keine Richtung. Für Vesikelmembranen, deren beide Seiten einschließlich der umgebenden Medien gleich sind, sollte stets $c_0 = 0$ sein.

Das Produkt aus den Hauptkrümmungen ist die Gauß'sche Krümmung, die in Gl. (2) die Beziehung zu der topologischen Eigenschaft der Membranfläche herstellt. Für Vesikelstrukturen, deren Topologie als geschlossene Flächen betrachtet werden kann, gilt der Satz von Gauß-Bonnet:

$$\oint c_1 c_2 \, dA = 4\pi (1 - q) \quad (3)$$

wobei $q = 0, 1, 2, \dots$ das Geschlecht der Fläche angibt (für Kugeln ist $q = 0$). Der Energiebeitrag des $\bar{\kappa}$ -Term zur Krümmungselastischen Gesamtenergie von Vesikeln ist daher völlig unabhängig von deren Form, solange sie geschlossen bleiben.

Die Größen κ und $\bar{\kappa}$ sind Elastizitätsmoduln mit der Dimension einer Energie. Mit Hilfe eines Doppelschicht-Modells, das die durch Einschränkung des Monoschicht-Molekülaustausches selbstinduzierte spontane Krümmung einer Membran beschreibt, konnte Helfrich den Wert des Krümmungselastischen Moduls unter Bezugnahme auf Flüssigkristalldaten zu $\kappa \approx 2.6 \cdot 10^{-12}$ erg abschätzen /HEL74a/. Erste experimentelle Ergebnisse wurden von Servuël et al. durch Analyse der Biegemoden thermisch fluktuierender Vesikeln gefunden. Diesen Messungen zufolge besitzt der Elastizitätsmodul bei Zimmertemperatur den Wert $\kappa = 2.3 \cdot 10^{-12}$ erg /SER76/. Vergleichbare Daten sind bisher nur durch Messungen an hemoglobinfreien Erythrocyten bekannt. Durch Auswertung der an diesen Körpern beobachteten Membranoszillationen erhielten Brochard und Lennon den Wert $\kappa = 2 \cdot 10^{-13}$ erg /BRO75/. Einen etwa dem von EL entsprechenden Wert ergaben die ebenfalls an Erythrocyten ausgeführten Deformationsexperimente von Evans, der den Modul mit $\kappa = 1.8 \cdot 10^{-12}$ erg angibt /EVA83/.

Der Modul der Gauß'schen Krümmung $\bar{\kappa}$ spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Bildung von solchen Mesophasen, die sich im wesentlichen nur durch ihre Topologie unterscheiden. Amphiphile Systeme mit mehreren derartigen Phasen sind keine Seltenheit. Die in Kap. V.2 dargestellten Untersuchungen ergeben den Hinweis auf eine schwach ausgeprägte Strukturänderung des Lecithin-Wasser-Systems, die vermutlich vom Hydrationsgrad abhängt, sich jedoch nach bisherigen Erkenntnissen nicht in dem Maße durch Temperaturänderungen beeinflussen läßt, wie dies für die binären Mischphasen wasserlöslicher Amphiphile der Fall ist /FON81/.

Der Wert dieses Moduls ist experimentell noch nicht bestimmt worden. Eine theoretische Abschätzung /HAR78/, die auf der Annahme der Existenz entgegengesetzter Spannungen zwischen

polaren und apolaren Teil des Lecithinmoleküls beruht, ergibt die Größe $\bar{\kappa} \approx 1 \cdot 10^{-12}$ erg. Zum gleichen Ergebnis kommen Petrov et al. /PET78/, deren Theorie die molekulare Asymmetrie der Monoschicht berücksichtigt.

Die krümmungselastische Gesamtenergie E_C einer unilamellaren Vesikel mit der Fläche A läßt sich berechnen nach

$$E_C = \int g_C \, dA \quad (4)$$

Für eine sphärische Vesikel mit $A = 4\pi R_0^2 = \text{const}$ und $c_1 = c_2 = R_0^{-1}$ ergibt dies mit Gl. (1) den Ausdruck

$$E_C = 8 \pi \kappa \left(1 - \frac{R_0 c_0}{2}\right)^2 + 4 \pi \bar{\kappa} \quad (5)$$

Diese Beziehung gestattet eine einfache Plausibilitätsbetrachtung, die Aufschluß über die Tendenz der Strukturentwicklung von Lecithin-Wasser-Systemen geben kann. Es lassen sich die beiden Zustände unterscheiden, für die i) $E_C > 0$ und ii) $E_C < 0$ ist. Für den Normalzustand der Doppelschicht mit $c_0 = 0$ erhält man dann

$$\begin{aligned} \text{i)} \quad & 2 \kappa + \bar{\kappa} > 0 \\ \text{ii)} \quad & 2 \kappa + \bar{\kappa} < 0 \end{aligned} \quad (6)$$

Dies bedeutet im ersten Fall, daß die Vesikelentstehung stark benachteiligt ist, während im zweiten Fall die spontane Bildung von möglichst vielen Vesikeln zu erwarten wäre.

Alle bisherigen Quelllexperimente sprechen gegen die spontane Vesikulation und erlauben daher die Annahme $-2\kappa < \bar{\kappa}$. Anhand der oben erwähnten Experimente konnte schließlich - in Übereinstimmung mit den theoretischen Ergebnissen - die Gültigkeit der weitergehenden Beschränkung $\bar{\kappa} > 0$ gezeigt werden.

Soweit die Elastizitätstheorie verläßlich angewendet werden kann, - Einschränkungen gelten für Ultraschallvesikeln, deren Durchmesser im 100 Å-Bereich liegen - läßt sich nach Gl. (5)

mit den Werten $\kappa = 2 \cdot 10^{-12}$ erg, $\bar{\kappa} = 1 \cdot 10^{-12}$ erg und $c_0 = 0$ die krümmungselastische Energie einer sphärischen Vesikel unabhängig von deren Radius zu $E_c = 6 \cdot 10^{-11}$ erg berechnen. Diese Energie ist zu gering, um eine signifikante Dehnung der Membranfläche von Vesikeln der hier untersuchten Größenordnung bewirken zu können. Daher wird die Form von Vesikeln ausschließlich durch die Krümmungselastizität bestimmt, sofern die Membran nicht durch einen (osmotischen) Überdruck in der Vesikel lateral gespannt ist und so eine straffe Kugel bildet.

Schwache ellipsoidale Deformationen der Kugel erfordern die elastische Energie /HEL73/

$$\Delta E_c = \frac{8}{5} \pi (6 - c_0 R_0) \kappa \frac{S_2^2}{R_0^2} \quad (7)$$

Die Abweichung von der sphärischen Form wird hier durch $S = R - R_0 = S_2 P_2(\cos\theta)$ angegeben, wobei P_2 das zweite Legendre-Polynom darstellt. (Diese "langwelligste" Formfluktuation soll hier nur als Beispiel dienen.)

Wegen des sehr kleinen Wertes von κ können Formfluktuationen thermisch angeregt werden. Die mittlere elastische Energie der dadurch hervorgerufenen Deformation ist nach dem Äquipartitionstheorem:

$$\langle \Delta E_c \rangle = \frac{1}{2} kT \quad (8)$$

Damit können die zu erwartenden Fluktuationsamplituden durch

$$\left\langle \frac{S_2^2}{R_0^2} \right\rangle^{1/2} = 2 \cdot 10^{-2} \quad (9)$$

angegeben werden. Dieses Ergebnis erklärt einerseits das Auftreten der bei hinreichend großen Vesikeln mikroskopisch gut zu beobachtenden Formfluktuationen, ebenso erkennt man aus

$$\langle S_2^2 \rangle^{1/2} \sim R_0 \quad (10)$$

die Skaleninvarianz ihrer mittleren Amplituden. Diese Invarianz wird sofort aufgehoben, sobald Kräfte auftreten, die laterale Spannungen in der Membran verursachen.

Das mittlere Amplitudenquadrat $\langle u^2 \rangle$ ebener Doppelschichten, läßt sich für den spannungsfreien Fall durch

$$\langle u^2 \rangle = \frac{kT}{4\pi^3 \kappa} A \quad (11)$$

ausdrücken /HEL84a/. A stellt hier einen quadratischen Membranflächenausschnitt dar, demgegenüber molekulare Parameter als vernachlässigbar klein anzusehen sind. Die von Helfrich zu diesem Thema durchgeführte theoretische Beschreibung zeigt /HEL78/, daß die Undulationen eine abstoßende Wechselwirkung zwischen parallelen Membranen hervorrufen. Der vorhergesagte Undulationsdruck f_{und} kann durch die Formel

$$f_{\text{und}} = 2 \frac{(kT)^2}{\kappa d_{\text{eff}}^3} \quad (12)$$

angegeben werden (mit einem möglichen Fehlerfaktor zwei). Hier ist $d_{\text{eff}} < d_w$ als effektiver Membranabstand benachbarter Membranen die gegebene Bedingung, die den Zusammenhang mit $\langle u \rangle$ herstellt. Der kleinere Abstand d_{eff} wird durch die Hydrathülle der Membranen verursacht, in die die undulierenden Lamellen nicht eindringen können.

Aus den theoretischen Überlegungen folgt weiter, daß die sterische Abstoßung stark genug sein sollte, um mit der zwischen den Membranen herrschenden van der Waals-Anziehung konkurrieren zu können. Dies wird experimentell durch die hierzu von Servuß durchgeführten Vesikelexperimente gestützt, die ergeben, daß durch osmotisch induzierte Undulationsunterdrückung ein van der Waal'scher Kohäsionseffekt bewirkt werden kann,

der für den normalen, spannungsfreien Fall nicht auftritt /SER84/. Die in Kap. V.3 dieser Arbeit erläuterten Untersuchungen des Quellens von planaren Vielschichtsystemen liefern weitere Aufschlüsse über die Undulationswechselwirkung, vor allem indem sie zeigen, daß man nur mit Hilfe dieser abstoßenden Wechselwirkung das (unbeschränkte) Quellen verstehen kann.

Die mit den abstoßenden Undulationskräften konkurrierende van der Waals-Anziehung kann der Theorie zufolge /NIN70, LAN74, NIR77/ für kleine Membranabstände von planaren Doppelschichten durch

$$f_{vdW} = - C(d_w) \frac{1}{d_w^3} \quad (13)$$

ausgedrückt werden. Für Vielschichtsysteme ändert sich zwar die Potenz langsam mit zunehmendem Membranabstand d_w , dennoch kann in diesem Fall der d^{-3} -Abfall beibehalten werden, wenn der Vorfaktor $C(d_w)$ in entsprechender Weise verkleinert wird. (Beispielsweise um den Faktor 2 bei $d_w = 200 \text{ \AA}$ /NIN70/.)

Der Koeffizient dieser Wechselwirkung konnte für $d_w = 27.5 \text{ \AA}$ durch eine Reihe verschiedener Kompressionsexperimente ermittelt werden /NEV77, PAR79, RAN81/. Die hier verwendeten Daten beziehen sich auf die von Le Neveu durchgeführten Röntgenexperimente an EL-Wasser-Dispersionen, in denen der Membranabstand d_w bei jeweils verschiedenem, osmotisch reguliertem Druck P_{osm} gemessen wurde /NEV77/. Die Interpretation dieser Messungen geht davon aus, daß für $d_w < 27.5 \text{ \AA}$ der Druck $|P_{osm}| \gg f_{vdW}$ stets durch eine gleichgroße interlamellare Abstoßung $|f_h|$ balanciert wird. Der funktionale Zusammenhang von f_h und d_w läßt sich durch

$$f_h = f_o e^{-\frac{d_w}{\lambda}} \quad (14)$$

beschreiben /MAR76/ und wird als Hydratationsabstoßung bezeichnet, da die Annahme besteht, daß die unterhalb des sog. Gleichgewichtsabstands einsetzende starke gegenseitige Abstoßung der Membranen durch deren Hydrathüllen verursacht wird.

Die durch Anpassung der Meßdaten (für 18 - 26.5 Å) an Gl. (14) ermittelten Konstanten f_0 und λ werden von den Autoren mit $f_0 = 1 \cdot 10^{11}$ dyn cm⁻² und $\lambda = 1.93$ Å angegeben. Ihre Extrapolation der Abstoßung f_h auf den sog. Gleichgewichtsabstand $d_w = 27.5$ Å bei $P_{osm} = 0$ ergibt $f_h = (5 \dots 8.5) \cdot 10^4$ dyn cm⁻², woraus wegen der für diesen Abstand geltenden Gleichheit von f_h mit der interlamellaren Anziehung f_{fdw} der Koeffizient aus Gl. (13) zu $C(d_w = 27.5 \text{ Å}) = (1 \dots 1.7) \cdot 10^{-15}$ erg bestimmt werden konnte. Die Verbreiterung dieses Wertes wird von Le Neveu et al. hauptsächlich zurückgeführt auf eine Ungenauigkeit von 0.5 Å bei der Ermittlung des Abstands $d_w = 27.5$ Å, bei dem sich - folgt man der Ansicht der Autoren - das Vielschichtsystem im thermodynamischen Gleichgewicht mit der wässrigen Phase befinden soll.

Eine Störung dieses Gleichgewichts erfolgt in jedem Fall, wenn dem EL elektrisch geladene Lipide beigemischt werden /RAN81, CCW78, LOO82/. Auf der Grundlage der Theorie elektrischer Doppelschichten läßt sich berechnen /COW78/, daß die elektrostatische Abstoßung f_{es} für kleine Membranabstände mit

$$f_{es} \sim \frac{1}{d_w} \quad (15)$$

abfällt und stark genug ist, um den Membranabstand entscheidend zu vergrößern. - Obwohl unsere Experimente mit dem elektrisch neutralen EL ausgeführt wurden, war eine Beeinflussung des Quellvorgangs durch sehr schwache ionische Verunreinigungen des Lecithins prinzipiell nicht auszuschließen. - In Kap. VI werden die genannten Wechselwirkungen bezüglich ihrer Einflußnahme auf die Quellentwicklung ausführlicher erläutert;

insbesondere wird nachgewiesen, daß die elektrostatische Abstoßung für die in dieser Arbeit relevanten Quellversuche keine Bedeutung haben sollte.

V. Experimentelle Untersuchungen und Meßergebnisse

V.1 Experimente an einzelnen Vesikeln

Wie erwähnt, ist mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen nachgewiesen worden, daß durch Ultraschalleinwirkung multilamellare Lecithinschichten in kleine unilamellare Vesikeln verwandelt werden können. Die Umwandlung verläuft wahrscheinlich über Membranfragmente, die sich schließen und sphärische Formen annehmen. Dieser Vorgang kann verstanden werden, wenn, wie von Helfrich formuliert /HEL74b/ eine Randenergie γ existiert, die - in Konkurrenz mit der elastischen Energie - ein Schließen der Lamellenflächen bewirkt. Dieses Konkurrenzverhalten beider Energien bildete den Ausgangspunkt des Versuchs, eine experimentelle Bestimmung von γ dadurch zu erreichen, indem Vesikeln mittels elektrischer Felder zum Öffnen ihrer Membranen veranlaßt werden sollten /HAR79/. (Taupin et al. /TAU75/ erhielten aus Osmose-Experimenten an kleinen DPPC- und EL-Vesikeln den Wert $\gamma = 0.65 \cdot 10^{-6} \text{ erg cm}^{-1}$.)

Zur Durchführung unserer Experimente wurden in das Innere der Probenkammer zwei parallele, 0.5 cm voneinander entfernte Platinelektroden angebracht. In Verbindung mit einem Funktionsgenerator erfolgte die Ausführung aller Versuche mit Wechselspannungen bei konstanter Frequenz $\nu = 2 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$. Da die spezifische Leitfähigkeit von Lecithinmembranen etwa $10^{-16} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ beträgt /TIE74/ und damit um viele Größenordnungen geringer ist als die des Wassers, dessen spezifische Leitfähigkeit mit $\approx 10^{-6} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ gemessen wurde, können die Vesikeln praktisch als Nichtleiter angesehen werden, die in diesem Fall von einem leitenden Medium umgeben sind. Als Folge davon existiert in dem von einer Vesikel eingeschlossenen Wasservolumen kein Feld; sämtliche Feldlinien verlaufen in der äußeren Umgebung der Membran. Bei einer derartigen Feldverteilung erfahren nichtsphärische Körper mit Isolatoreigenschaft eine bezüglich ihrer Vorzugsachsen parallel zum Feld ausge-

richtete Orientierung /SCH65/, deren Ursache in den dem äußeren Feld zuzuordnenden Maxwell-Spannungen gesehen werden kann /HEL74c/.

Ein erster bemerkbarer Orientierungseffekt von länglichen Vesikeln tritt bereits bei relativ schwachen Feldern von etwa $E = 15 \text{ Vcm}^{-1}$ auf; dabei lassen sich weiterhin Membranfluktuationen detektieren, die erst mit Feldstärken $E \gtrsim 30 \text{ Vcm}^{-1}$ vollständig verschwinden, so daß die Membranen dann "geglättet" erscheinen. Zur experimentellen Durchführung wurden meist unilamellare Vesikeln ausgewählt, die sich gewöhnlich leicht mittels elektrischem Durchschlag öffnen ließen. (Eine ähnliche Methode wurde von Zimmermann zur Fusion von Lecithinvesikeln verwendet /ZIM81, ZIM82/) Bei anschließender Erhöhung des Feldes vergrößern sich die Öffnungen, bis die Vesikel schließlich eine zylindrische Form annimmt. Ein Zwischenstadium dieser Formänderung ist durch die folgende Abbildung wiedergegeben.



Abb. 6: Phasenkontrastaufnahme einer geöffneten Vesikel bei $E = 35 \text{ Vcm}^{-1}$

Eine Abschätzung der Durchschlagsspannung ΔV , die mit Hilfe der Beziehung

$$E \cdot L = 2 \Delta V$$

vorgenommen wurde, ergab - in Übereinstimmung mit den aus der Literatur bekannten Daten /TIE74/ - für unilamellare Vesikeln der Länge L den Wert $\Delta V \approx 100 \text{ mV}$.

Im allgemeinen konnte eine Zunahme der Zylinderlänge mit gleichzeitiger Verringerung des Radius bei Erhöhung der Feldstärke beobachtet werden. Die Zylinderfläche A blieb dabei jeweils konstant. Dieser Effekt tritt besonders auffällig bei multilamellaren Vesikeln in Erscheinung. Unilamellare Zylinder haben oberhalb einer gewissen Feldstärke ihre Länge nicht mehr verändert. Da das Feld in diesem Zustand eine ausschließlich formstabilisierende Funktion hat, ergibt sich die Möglichkeit, die Randenergie aus der Analyse eines rein mechanischen Gleichgewichts zu gewinnen.

Die mechanische Energie eines idealen Hohlzylinders mit dem Radius R setzt sich aus den Anteilen der Randenergie sowie der krümmungselastischen Energie zusammen. Die Randenergie ist gegeben durch

$$E = 2 \cdot 2 \pi R \gamma, \quad (16)$$

wobei γ die Energie pro Länge des Randes darstellt. Nach Gl. (4) ergibt sich die krümmungselastische Energie zu

$$E_c = \frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 \cdot A \quad (17)$$

Dabei ist die Zylinderfläche

$$A = 2 \pi R L = \text{const} \quad (18)$$

Da eine der beiden Hauptkrümmungen Null ist, entfällt der $\bar{\kappa}$ -Term. Die von Null verschiedene Hauptkrümmung ist gleich dem Reziproken des Zylinderradius. Für unilamellare Membranen kann außerdem davon ausgegangen werden, daß durch die Randbildung wegen der Zusammenführung beider Monoschichten die Unterscheidung zwischen Innen und Außen der Doppelschicht sowie ihrer wässrigen Umgebung aufgehoben wird. Daher darf erwartet werden, daß die spontane Krümmung c_0 ebenfalls Null ist. Mit diesen Voraussetzungen ergibt sich für die elastische Energie die Beziehung

$$E_C = \frac{1}{2} \kappa \frac{1}{R^2} A \quad (19)$$

und der Ausdruck für die gesamte mechanische Energie lautet dann

$$E_{\text{mech}} = 4\pi\gamma RL + \frac{\kappa A}{2R^2} \quad (20)$$

Die Variation von E_{mech} als Funktion von R als Ausdruck der Zylinderform niedrigster Energie führt zu

$$\frac{dE_{\text{mech}}}{dR} = 4\pi\gamma L - \frac{\kappa A}{R^3} = 0 \quad , \quad (21)$$

woraus schließlich durch Einsetzen von Gl. (18) die folgende Gleichung für die Randenergie erhalten werden kann:

$$\gamma = \frac{\kappa L}{2R^2} \quad (22)$$

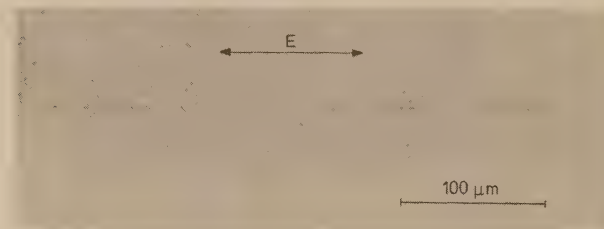


Abb. 7: Beidseitig geöffneter Zylinder in seinem Endzustand. Durch Steigerung der Feldstärke läßt sich keine weitere Längenänderung mehr erzielen.

Alle γ -Messungen wurden an Zylindern durchgeführt, die den geringsten optischen Kontrast aufwiesen und eindeutig unilamellar waren. In der photographischen Aufnahme der Abb. 7 ist ein derartiger Zylinder in seinem Zustand maximaler Länge wiedergegeben.

Die an den Negativen solcher Photographien durchgeführten photometrischen Auswertungen der Zylinderradien ergaben mit $\kappa = 2.3 \cdot 10^{-12}$ erg die in der folgenden Tabelle aufgeführten Werte für die Randenergie:

Tabelle I

R/ μm	L/ μm	$\gamma/\text{erg cm}^{-1}$
1.4	360	$2.1 \cdot 10^{-6}$
1.5	292	$1.5 \cdot 10^{-6}$
1.6	295	$1.4 \cdot 10^{-6}$

Es muß dabei angemerkt werden, daß sich die Experimente, die nur in drei Fällen zum Erfolg führten, über einen Zeitraum von mehreren Monaten erstreckten. Eine zunehmende bräunliche Verfärbung während dieser Zeit deutete darauf hin, daß das verwendete Lecithin durch Oxydationsprodukte verunreinigt wurde. Dieser Umstand würde auch eine Erklärung dafür liefern, daß die größte Randenergie zuerst gemessen wurde. Einerseits sind deswegen die Resultate nicht als endgültig anzusehen, andererseits ergibt sich zusätzlich der Hinweis, daß die Randenergie sehr empfindlich auf Verunreinigungen anspricht, die sich im Rand wegen seiner stark unterschiedlichen Struktur bevorzugt aufhalten können. Die dargestellte Meßmethode sollte geeignet sein, bestimmte Stoffe bezüglich ihrer Eigenschaft als Randbildner zu untersuchen.

V.2 Experimente an ungeordneten Lecithinschichten

Der in der Einleitung dieser Arbeit dargestellte schematische Aufbau eines planaren Vielschichtsystems stellt den Idealfall einer ungestörten lyotrop-smektischen Phase dar. Ein dem Realfall eher entsprechendes Bild vermitteln die an solchen Systemen vorgenommenen elektronenmikroskopischen Defektstruktur-Untersuchungen von Kléman et al. /KLE76/. Neben den gewöhnlichen, in lamellaren Schichten vorkommenden linearen Singularitäten wurde dort ein weiterer, bis dahin unbekannter Morphologiedefekt nachgewiesen, dessen Deutung nahelegte, die Existenz einer durch tunnelartige Minimalflächenverbindung hergestellte topologische Kopplung zwischen benachbarten Membranen anzunehmen. Eine Interpretation der elektronenmikroskopischen Aufnahmen lieferte außerdem den Hinweis, daß die Häufigkeit des Auftretens derartiger Defekte maßgeblich vom Wassergehalt der Proben abhängt. Obwohl von Kléman nicht systematisch untersucht, kann seiner Arbeit entnommen werden, daß die Bildung dieses Defekttyps unterhalb einer Wasserkonzentration von etwa 20 vol.% nicht vorkommt.

Entgegen der Ansicht einiger Autoren /PET78/ konnte durch eigene Untersuchungen des Quellverhaltens von relativ dünnen, vollständig von Wasser bedeckten Eilecithin-Schichten gezeigt werden, daß Membranverbindungen - von uns als Passagen bezeichnet - noch weit oberhalb des "Sättigungsgrades" von 55 vol.% Wassergehalt entstehen können /HAR78/.

Die genauere Beobachtung zeigte, daß Passagenbildungen in weitgehend inhomogenen, nur sehr langsam quellenden Probenbereichen bevorzugt auftreten. Dabei nehmen die durch Passagen verbundenen Lecithinschichten innerhalb einiger Tage einen deutlich (lichtmikroskopisch) auflösbaren Abstand ein. Bei einem Abstand, der nahe der Auflösungsgrenze liegt, konnte in einigen Fällen noch eindeutig eine Zunahme der Passagendichte festgestellt werden. Mit fortschreitender Membranseparation -

begleitet von einer gleichzeitigen Zunahme der Passagengröße - lassen sich zwei verschiedene Strukturentwicklungen unterscheiden:

- i) das lamellare System paralleler Membranen zeigt die Tendenz, Doppelschicht-Paare zu bilden, die offensichtlich durch Passagen miteinander verbunden sind. Es fällt auf, daß der Abstand zwischen den Doppelschicht-Paaren über große Bereiche nahezu konstant ist. (siehe Abb. 9a)
- ii) die Passagen organisieren sich solchermaßen zu dreidimensionalen Gitterstrukturen, so daß zwei kontinuierliche, durch Doppelschichten voneinander getrennte gleichgroße Wasserbereiche entstehen. (siehe Abb. 9b)

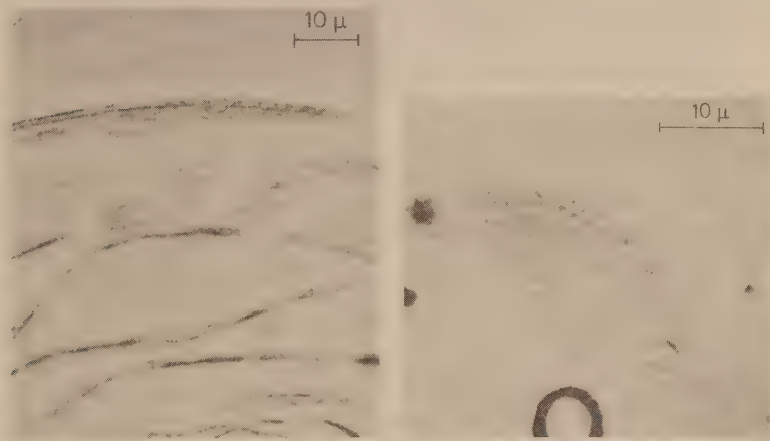


Abb. 9a,b: Beispiel für Kopplungen von Doppelschicht-Paaren (9a). Beispiel für ein dreidimensionales Passagen-gitter (9b). In beiden Fällen befindet sich das freie Wasser jeweils oberhalb der Struktur.

Die Interpretation des in Abb. (9b) gezeigten Gitters ergibt die Raumgruppenzuordnung $Pn3m$. (Die beiden getrennten Wasserbereiche stellen in diesem Fall sich gegenseitig durchdringen-

de Diamantgitter dar) /HEL81/. Strukturen, wie sie die beiden Abbildungen zeigen, konnten auch für Phosphatidylethanolamin-Systeme nachgewiesen werden /JUN69, HUI81/. Die dabei auftretenden Gitterparameter waren allerdings sehr viel kleiner und schwankten zwischen 100 - 2000 Å.

Wenngleich Proben mit Defekten der beschriebenen Art verhältnismäßig schwer reproduzierbar waren und nur selten beobachtet werden konnten, darf aufgrund dieser Beobachtung angenommen werden, daß während des Quellvorgangs eine durch Passagenbildung erfolgende Fusion zwischen einzelnen Membranen energetisch begünstigt erscheint. Um einen Ausdruck für die minimale Energie einer Passagenbildung zu erhalten, kann wiederum von der durch Gl. (2) formulierten Beziehung für die krümmungselastische Energiedichte g fluider Membranen ausgegangen werden. Die Energie einer Passage wird im wesentlichen durch den Sattelspreizungsterm kontrolliert, da sich eine Konfiguration einstellt, die den ersten Term der krümmungselastischen Energie

$$\frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 \quad (23)$$

verschwinden läßt bzw. möglichst klein macht. Für symmetrische Doppelschichten mit $c_0 = 0$ ist die "Konstruktionsvorschrift" für Minimalflächen

$$c_1 + c_2 = 0 \quad (24)$$

Die quantitative Beschreibung einer rotationssymmetrischen Passagenform (siehe Abb. 10) vereinfacht sich in diesem Fall wegen Gl. (24) und kann analytisch durchgeführt werden (siehe unten). Ebenso lassen sich die Formen von "energielosen" Passagen, die sich aus der Bedingung $c_1 + c_2 - c_0 = 0$ mit $c_0 \neq 0$ ergeben, ohne aufwendige Rechnungen am Computer bestimmen /DEU77/.

Durch die Einführung der Funktion $\Psi(x)$, die den Winkel zwischen der Membranoberflächennormalen und der Rotationsachse beschreibt (siehe Abb. 11), kann die Passagenkontur $z(x)$ durch

$$z(x) = \int_{r_0}^x \tan \Psi(x) \, dx \quad (25)$$



Abb. 10: Isolierte Passage innerhalb parallel angeordneter Lecithinmembranen.

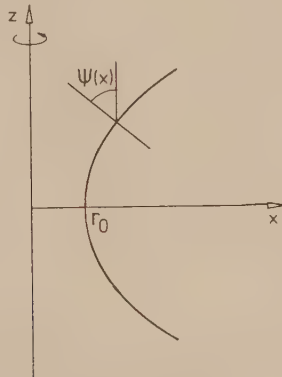


Abb. 11: Koordinaten zur theoretischen Beschreibung einer rotationssymmetrischen Passagenkontur.

und die beiden Hauptkrümmungen entlang der Meridiane (c_1) und der Breitenkreise (c_2) mit Hilfe der Beziehungen

$$c_1(x) = \cos(x) \frac{d\psi(x)}{dx}, \quad c_2(x) = \frac{\sin\psi(x)}{x} \quad (26)$$

ausgedrückt werden /HEL73/.

Durch Bildung der Ableitung

$$\frac{dc_2(x)}{dx} = \frac{\cos\psi(x) \frac{d\psi(x)}{dx} x - \sin\psi(x)}{x^2} = \frac{c_1(x) - c_2(x)}{x} \quad (27)$$

wird ermöglicht, daß $\psi(x)$ eliminiert werden kann und unter Einbeziehung der Minimalflächenbedingung erhält man die lineare Differentialgleichung

$$\frac{dc_2(x)}{dx} = - \frac{2c_2(x)}{x} \quad (28)$$

deren Lösung

$$c_2(x) = \frac{K}{x} \quad (29)$$

als neue unabhängige Variable zur Bestimmung der Passagenkontur verwendet wird. Die Integrationskonstante K läßt sich aus der für Passagenformen geltenden Nebenbedingung ermitteln: für $x = r_0$ wird $\psi(x) = \pi/2$. Die liefert zusammen mit Gl. (29) den Wert $K = r_0$. Damit kann die Hauptkrümmung $c_2(x)$ aus Gl. (26) in die Form

$$\psi(x) = \arcsin \frac{r_0}{x} \quad (30)$$

Überführt werden, die eine weitere Eliminationsbeziehung für die Funktion $\psi(x)$ im Integralausdruck für $z(x)$ darstellt. Mit Gl. (30) kann schließlich für die Kontur über

$$z(x) = \int_{r_0}^x \frac{r_0}{x} \left[1 - \left(\frac{r_0}{x} \right)^2 \right]^{-1/2} dx \quad (31)$$

ein genereller Ausdruck für die Passagenform angegeben werden:

$$z(x) = r_0 \ln \left(\frac{x}{r_0} + \left[\left(\frac{x}{r_0} \right)^2 - 1 \right]^{1/2} \right) . \quad (32)$$

Wegen der symmetrischen Konstitution der Doppelschicht, also für $c_0 = 0$, wird die Formenvielfalt "energieloser" Membranstrukturen eingeschränkt. Zwei Beispiele für den ersten Quadranten solcher theoretischen Konturen sind in der Abb. 12 wiedergegeben.

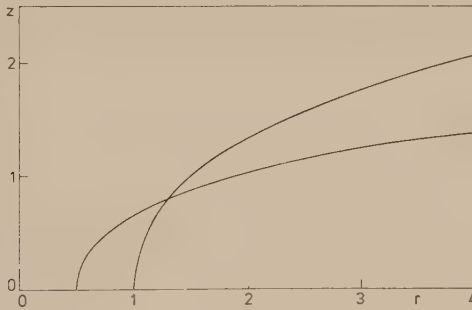


Abb. 12: Theoretische Konturen für Passagen, die sich aus den Bedingungen $c_1 + c_2 = 0$ und $c_0 = 0$ ergeben.

Da die Membran eine endliche Schichtdicke besitzt, sollte im Realfall die theoretische Möglichkeit $r_0 = 0$ ausgeschlossen sein, was konkret bedeuten würde, daß Passagen unterhalb eines kritischen Lamellenabstands nicht existieren dürften.

Da die minimale Energie einer einzelnen Passage praktisch allein durch die Gauß'sche Krümmung und damit durch

$$g_p = \kappa c_1 c_2 \quad (33)$$

bestimmt wird, läßt sich die Angabe ihrer Gesamtenergie anhand eines einfachen Gedankenexperiments herleiten.

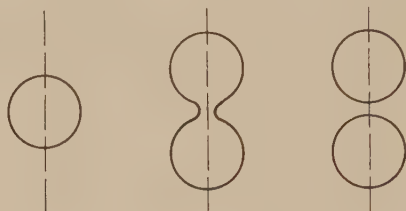


Abb. 13: Drei rotationssymmetrische Vesikelstrukturen, deren mittlere eine Passage enthält.

Die obige Abbildung soll einen möglichen Trennungsvorgang einer sphärischen Vesikel darstellen; im intermediären Stadium sind hier die beiden Sphären über eine Passagenform miteinander verbunden. Die Gesamtenergie der Gauß'schen Krümmung beträgt für die beiden ersten Formen jeweils

$$\bar{\kappa} \int c_1 c_2 \, dA = 4 \pi \bar{\kappa} \quad (34)$$

Für die getrennten Sphären ist sie doppelt so groß. Es erscheint daraus evident, daß die minimale elastische Energie E_p einer Passage durch

$$E_p = - 4 \pi \bar{\kappa} \quad (35)$$

gegeben ist. Da die Hauptkrümmungen entgegengesetzte Vorzeichen haben, kann aus diesem Ergebnis auf $\bar{\kappa} > 0$ geschlossen werden. Nach den experimentellen Beobachtungen sollte dies zumindest für einen bestimmten Wasserkonzentrationsbereich zutreffen. In diesem Bereich kann daher die Bildung von Passagen als Indiz für eine stattfindende Verminderung der freien Energie des Lecithin-Wasser-Systems angesehen werden.

V.3 Phänomenologische Beschreibung der Quellentwicklung von geordneten Lecithin-Vielschichtsystemen

V.3.1 Die Einleitung des Quellvorgangs

Die z.T. unbefriedigenden Ergebnisse der Versuche, eine gute Reproduzierbarkeit der im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Passagengitter zu erreichen, waren neben den eingangs erwähnten Gründen Veranlassung dafür, nach geeigneteren experimentellen Voraussetzungen zu suchen, unter denen der Quellvorgang auf möglichst regelmäßige, regulierbare Weise ablaufen würde. Allgemein lassen sich für die hier beschriebenen Quellmethoden drei verschiedene, praktisch gleichzeitig entstehende Strukturtypen angeben, die - relativ unabhängig vom Ordnungszustand des Ausgangssystems - das Erscheinungsbild der Proben prägen:

- i) im kompakten Lecithinbereich entstehen während der Wasseraufnahme Defektstrukturen, insbesondere die sogenannten "öiligen Streifen" /REI1888/.
- ii) im Grenzbereich Lecithin-Wasser erfolgt eine normalerweise völlig ungeordnete Myelinbildung.
- iii) in der wässrigen Phase treten verschiedenartige, teils zusammenhängende, teils isolierte, unilamellare und multilamellare Vesikelstrukturen auf.

Wenn der Quellvorgang an defektarmen, homeotrop geordneten Vielschichtsystemen ausgeführt wird, die die gesamte Höhe der Probenkammer ausfüllen, verlagert sich der Schwerpunkt der Strukturbildung ganz auf die Lecithin-Wasser-Randzone. Nachdem das Wasser in Kontakt mit dem Lecithin getreten ist, bilden sich hier spontan kompakte zylindrische Myelinformen, die aus der geordneten L_α -Phase in das wässrige Medium 'hineinwachsen'. Bei gut orientierten Proben mit geringer Schichtdicke ($D \lesssim 40 \mu\text{m}$) entwickelt sich im Laufe dieses ersten Quellstadiums eine stets reproduzierbare, geometrisch regel-

mäßig ausgebildete Myelinstruktur. Da die in die wässrige Phase quellenden Zylinder eine auffallend starke Tendenz zeigen, sich parallel zueinander anzuordnen, kommt es zur Ausprägung von äquidistanten Mustern, deren charakteristische Erscheinung durch Abb. 14 wiedergegeben wird. Diese Muster sind bisher anscheinend noch nicht beobachtet worden, weil stets mit dickeren Proben gearbeitet wurde.



Abb. 14: Typisch "normales" Muster äquidistant angeordneter Lecithinzylinder, die aus der geordneten L_{α} -Phase in das freie Wasser 'wachsen'. Die Phasenkontrastaufnahme wurde einige Stunden nach Einleitung des Quellvorgangs aufgenommen. Die Probenhöhe beträgt ca. 20 μm . Im Phasenkontrast erscheinen hier die Zylinder als dunkle Linien, deren Breite jedoch nicht die wahren Zylinderdurchmesser wiedergeben. Maßstab: 100 μm .

Die in Abb. 14 wiedergegebene Phasenkontrastaufnahme zeigt eine derartige Äquidistanzstruktur wenige Stunden nach Einleitung des Quellvorgangs. Verfolgt man diese Entwicklung genauer, zeigt sich, daß der Quellprozeß in diesem ersten Stadium nicht allein über das Ausbilden von Lecithinzylindern abläuft. Zeitlich parallel zur 'normalen' Entwicklung findet ein 'inverser' Vorgang statt: Die wohlgeordnete L_{α} -Phase erfährt

durch das Eindringen von Wasserkanälen eine Vergrößerung ihrer Randbereiche, deren geometrische Form in diesem Fall immer durch zwei sich gegenüberliegende Halbzylinder gebildet wird. Sofern sich diese Halbzylinder in Kontakt miteinander befinden, wird dadurch der Wasserkanal in eine obere und untere Hälfte geteilt. (Dies gilt natürlich ebenso für die ins Wasser quellenden Vollzylinder.) Genauso wie diese ordnen sich die Wasserkanäle bevorzugt äquidistant an, so daß topologisch der Zusammenschluß zweier Halbzylinder zu einem Vollzylinder ermöglicht wird. Anders ausgedrückt: ein halbzylindrischer Rand besitzt die Tendenz, sich zu falten. Dadurch entsteht in der von Wasserkanälen durchzogenen L_{α} -Phase ein Quellmuster, dessen struktureller Aufbau mit dem der aus dem normalen Quellvorgang resultierenden Äquidistanzen identisch ist. Dies wird durch Abb. 15 anschaulich verdeutlicht. Die hier gezeigte 'inverse' und die in Abb. 14 dargestellte 'normale' Äquidistanzstruktur entstammen beide der gleichen Probe.



Abb. 15: Typisch 'inverses' Äquidistanzmuster von Wasserkanälen, die die geordnete L_{α} -Phase durchsetzen. Maßstab: 100 μm .

Die oben dargestellte Strukturgeometrie der Äquidistanzmuster läßt sich nicht allein anhand der gezeigten Phasenkontrastaufnahmen ermitteln. Abgesehen von deren relativ geringen Vergrößerungsstufe, die ohnehin das Erkennen von Details nicht zuläßt, wird durch die als helle Linien erscheinende Überblendung - hervorgerufen durch den erwähnten Halo-Effekt - eine Bestimmung der wahren Zylinderausdehnung verhindert bzw. erheblich erschwert. Um eine Fehlinterpretation bei der Strukturdeutung zu vermeiden, wurden zusätzlich andere Untersuchungsmethoden verwendet (Dunkelfeld, Polarisation), mit deren Hilfe sich einwandfrei nachweisen läßt, daß zwischen benachbarten äquidistanten Zylindern respektive gegenüberliegenden Halbzylindern kein optisch auflösbarer Abstand vorhanden ist.

Mit der Methode der Grenzflächeninterferenz läßt sich das wichtigste, den Anfangszustand des Quellsystems charakterisierende Strukturmerkmal detektieren: Die Durchmesser der Lecithinzyylinder sind bezüglich ihrer Ausdehnung identisch mit der Höhe der Probenkammer. Gleichzeitig gestattet die quantitative Auswertung der durch den Kontakt zwischen Lecithin und Glas erzeugten Interferenzstreifen die Ermittlung der Geometrie der einzelnen Äquidistanzstrukturelemente, deren kreisförmiger Querschnitt erst durch dieses Verfahren eindeutig nachgewiesen werden kann (und damit die Rechtfertigung liefert, von Zylindern bzw. Halbzylindern zu sprechen). Die Berechtigung, die Lecithinzyylinder als 'kompakt' zu bezeichnen, läßt sich dem Ergebnis der Fluoreszenzmessungen entnehmen: Die Auswertung von Intensitätsprofilen zeigt, daß die Lecithindichte der Zylinder zu Quellbeginn mit der des Vielschichtsystems übereinstimmt. Mit der Fluoreszenzmethode können so etwaige, während der weiteren Quellentwicklung auftretende Materialinhomogenitäten bequem verfolgt werden. Abb. 16 zeigt eine Anordnung von kompakten äquidistanten Zylindern mit konstanter Lecithindichte.

Die typische Bildungsgeometrie der ('normal' und 'invers' induzierten) Äquidistanzmuster bleibt für verschiedene Probenhöhen D im Bereich $5 - 40 \mu\text{m}$ erhalten. Für $D \gtrsim 40 \mu\text{m}$ treten

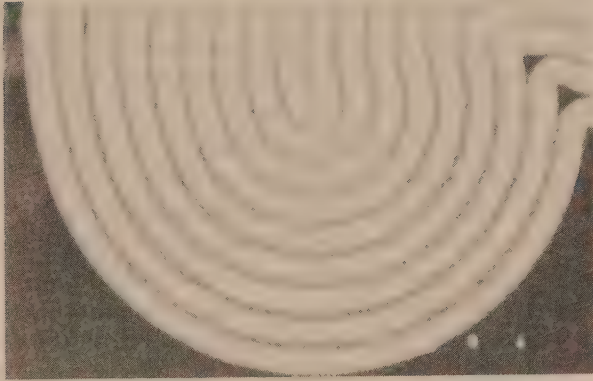


Abb. 16: Stark gebogene äquidistante Zylinder im freien Wasser. Die Fluoreszenzaufnahme vermittelt hier einen Eindruck über die Konstanz der Lecithindichte. Die Probenhöhe beträgt 18 μm . Maßstab: 40 μm .

erste Abweichungen von der regelmäßigen Anordnung auf: Die Durchmesser der aus der L_α -Phase wachsenden Zylinder stimmen nicht mehr in allen Fällen mit der Probenhöhe überein und es kommt zu lokalen Vertikalverbiegungen der Äquidistanzen. Dennoch bleibt zunächst deren Orientierungsführung an der unteren oder oberen Glasbegrenzung bestehen. Mit zunehmender Schichtdicke geht jedoch das äquidistante Ordnungsgefüge weitgehend verloren und die Quellstrukturen des Grenzbereichs von wässriger - sowie der L_α -Phase nehmen überwiegend die unübersichtlichen Formen der bekannten Myelinknäuel und - helices an.

In den ersten Stunden nach Quellbeginn wachsen die Zylinder mit recht ungleichmäßiger Geschwindigkeit in das freie Wasser. In einigen Fällen wurden maximale Geschwindigkeiten der Größenordnung von $\approx 1 \mu\text{m s}^{-1}$ gemessen. (Diese und folgende Zahlenangaben beziehen sich auf Proben mit $D = 20 \mu\text{m}$) Derartige Meßdaten können jedoch nur als grobe Näherungswerte angesehen werden, weil die durch gleichzeitig ablaufende inverse Randbildungen bedingten Veränderungen der Wachstumsgeschwindigkeit nicht berücksichtigt wurden. Außerdem ist hier außer

acht gelassen, daß durch Defektbildungen ("ölige Streifen"), die in der an Äquidistanzstrukturen angrenzenden Quellzone des restlichen kompakten L_α -Bereichs entstehen, zusätzliche Unregelmäßigkeiten im Zeitverlauf der Quellentwicklung verursacht werden können. Die Auswertung einiger hundert Proben läßt dennoch die generelle zeitliche Entwicklungstendenz der Quellstrukturen erkennen: Nach 12 - 18 h erscheint das Zylinderwachstum drastisch reduziert, so daß die Äquidistanzmuster dann als quasi-statische Strukturen betrachtet werden können. Weitere merklich feststellbare Strukturänderungen lassen sich dann nur noch zuverlässig nachweisen, wenn die Beobachtung der Proben in längeren Zeitabständen (≈ 12 h) erfolgt. Die Abb. 17 zeigt eine typische normale Randkonfiguration zu Beginn des quasi-statischen Quellstadiums. Der Focus befindet sich hier, wie auch in den folgenden Bildbeispielen stets in der Probenmitte.

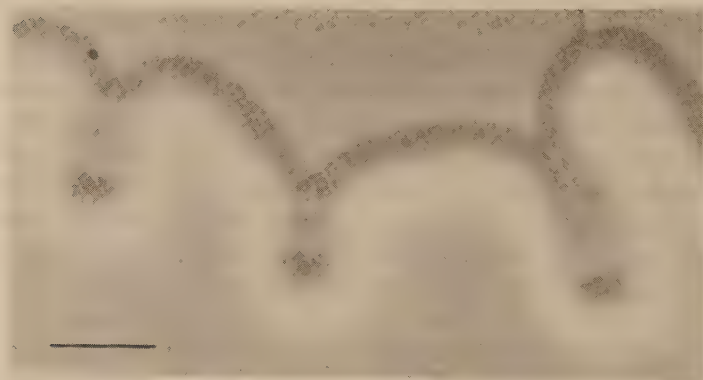


Abb. 17: Phasenkontrastaufnahme des Randes der geordneten L_α -Phase. Die in das freie Wasser (unten im Bild) tretenden Zylinder sind das Ergebnis einer Randfaltung des Vielschichtsystems. Die hellen Linien in der Mitte der Zylinder sind verursacht durch einen Wasserkern. Die Probenhöhe beträgt 20 μm . Maßstab: 20 μm .

Diese Abbildung verdeutlicht den charakteristischen Bildungsmechanismus der Zylinderform, die sich aus entsprechenden Faltungen des halbzyllindrischen Randes der L_{α} -Phase ergibt. Die schwächeren, hell erscheinenden Linien im Innern der Zylinder weisen auf eine Diskontinuität in der optischen Dichte des Lecithins hin. Derartige, in diesem späteren Quellstadium deutlicher als vorher detektierbaren Linien kennzeichnen die Bildung und Entwicklung eines Wasserkerns. Die um diesen Kern konzentrische Anordnung lamellarer Zylinder - verifizierter durch Phasenkontrast- und Polarisationsverfahren - stimmt mit der durch elektronenmikroskopische Techniken nachgewiesenen Doppelschichtkonfiguration kompakter Liposomen überein /PAP73/.

Ein anderes, die Quelldynamik wesentlich charakterisierendes Merkmal liefert die genaue, zu Beginn des quasi-statischen Zustands durchgeführte Vermessung der Äquidistanzstrukturen. Abweichend von ihrem vorherigen exakt kreisförmigen Querschnitt läßt sich nunmehr eine (zunächst schwache), bezüglich des Wasserkerns symmetrische laterale Verbreiterung der Zylinder nachweisen. Zusätzlich entsteht eine Verformung der Zylinder an der unteren und oberen Glasbegrenzung: hier kann mit Hilfe der Interferenzmethode eine durch beidseitige Abplattung der Zylinder erzeugte Ausprägung von jeweils gleichgroßen Kontaktflächen verfolgt werden. Diese 'sanft' verlaufenden Formänderungen - Anzeichen für eine fortgesetzte Wasseraufnahme durch das Lecithin - erfolgen ebenso in den 'inversen' Strukturen. Dabei bleibt in beiden Fällen die Äquidistanzordnung weiterhin streng erhalten.

Abb. 18 zeigt eine in ihrer zeitlichen Entwicklung mit der in Abb. 17 dargestellten Struktur vergleichbare Situation, die durch 'inversen' Prozeß entstanden ist.

Anhand dieser Aufnahme läßt sich besonders gut das Zustandekommen 'inverser' Äquidistanzmuster erkennen: Der Raum zwischen benachbarten Wasserkanälen wird bevorzugt durch kompakte

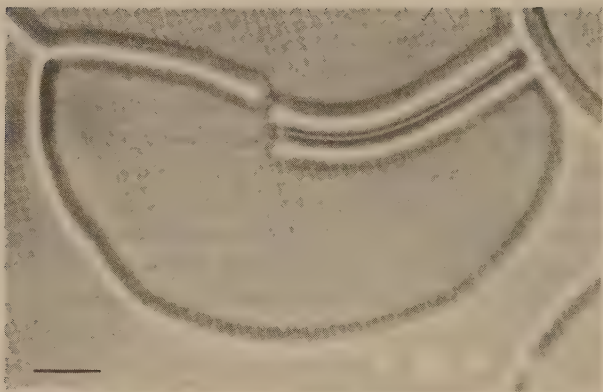


Abb. 18: Phasenkontrastaufnahme von Wasserkanälen, die in die geordnete L_α -Phase 'hineinwachsen'. (Das freie Wasser befindet sich in der unteren Bildhälfte) Der durch zwei parallele Wasserkanäle gebildete Zylinder enthält wiederum deutlich sichtbar einen Wasserkern. Die feinen Linien in der L_α -Phase sind verursacht durch smektische Dislokationen (siehe unten). Die Probenhöhe beträgt 8 μm . Maßstab: 20 μm .

Zylinder ausgefüllt. In der Abbildung ist deutlich der Wasserkern des sich zwischen den beiden L_α -Rändern befindlichen Zylinders zu erkennen. Es erscheint hiernach klar, daß die Äquidistanzabstände 'normaler' Strukturen mit denen von 'inversen' Mustern identisch sein müssen. Abgesehen von der experimentellen Bestätigung dieses Sachverhalts läßt sich außerdem in den planar orientierten Gebieten der L_α -Phase letztgenannter Strukturen das Auftreten smektischer Dislokationen nachweisen. (In der Abb. 18 teilweise gut durch die feinen, die L_α -Phase durchziehenden Linien wiedergegeben). Zu Beginn ihrer Entstehung können diese relativ häufig vorkommenden Defekte hauptsächlich in der Probenmitte lokalisiert werden. Die weitere Beobachtung ergibt, daß diese Linien von der der L_α -Phase zu-

gewandten Wasserkernregion des konzentrisch-lamellaren Randes ausgehen. Daher darf vermutet werden, daß solche Linien den Ort der Faltung einer oder mehrerer Doppelschichten markieren.

Bei der Verfolgung der Quellentwicklung über einen längeren Zeitraum (24 - 60 h) kann eine deutliche Zunahme der Defektlinien festgestellt werden. Ihre Lokalisierung bleibt dabei nicht mehr allein auf die Ebene der Probenmitte beschränkt, sondern erstreckt sich in zunehmendem Maße auch über den Vertikalbereich des Vielschichtsystems. Während dieser Zeit wandern die Linien, sich vom Rand lösend, bevorzugt in das innere Gebiet der L_{α} -Phase. Ihre Beweglichkeit deutet hin auf einen im Vielschichtsystem stattfindenden Materialtransport, durch den in der L_{α} -Phase lokale Änderungen der Lamellenzahl bewirkt werden. Unsere Untersuchungen ergaben, daß die Messung der damit verbundenen Änderung der Lecithindichte geeignete Anhaltspunkte liefert, anhand derer die zeitliche Entwicklung des Quellvorgangs verläßlich charakterisiert werden kann. Dies wird neben den weiteren, durch fortgesetzte Wasseraufnahme des Lecithins sich ergebende Strukturänderungen in Kap. V.3.3 näher dargestellt.

V.3.2 Die Unterbrechung des Quellvorgangs: durch Wasserentzug induzierte Strukturänderungen

Durch zahlreiche, zu verschiedenen Stadien des Quellens vorgenommene Experimente zeigte sich, daß die durch kontrollierte Verdunstung des noch freien sich in der Probe befindlichen Wassers eingeleitete Unterbrechung des Quellvorgangs zu einer Reihe neuer, spezifisch an Äquidistanzstrukturen zu beobachtenden Deformationen führt. Das derartigen Strukturänderungen zugrundeliegende Phänomen läßt sich am deutlichsten anhand der in Abb. 19a gezeigten, optisch als zick-zack-Muster erscheinenden Verformung eines in die L_{α} -Phase eingedrungenen Wasserkanals erläutern: Die sich gegenüberliegenden halbzyklrischen Randzonen bilden alternierend periodisch angeordnete

Paare von glockenförmigen Ausstülpungen, die jeweils den unteren und oberen Raum der entsprechenden Wasserkanalhälften (teilweise) ausfüllen.

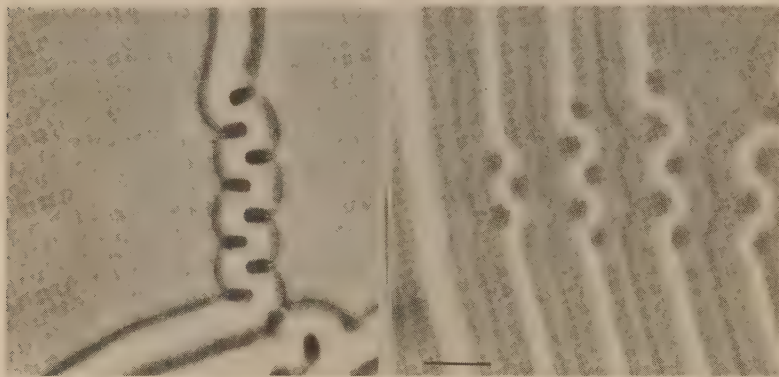


Abb. 19a,b: Typische Deformation eines Wasserkanals bei behutsam eingeleitetem Wasserentzug. Probenhöhe 20 μm . 19b: Anfangsstadium der Deformation an äquidistanten Wasserkanälen. Probenhöhe 22 μm . Beide Aufnahmen im Phasenkontrast. Hier ist deutlich die Deformation der Wasserkernlinie zu erkennen. Maßstab: 40 μm .

Das im Experiment durch Focusänderung nachweisbare paarweise Aufspalten eines Deformationselements in eine obere und untere Ausstülpung kann mit Hilfe einer photographischen Aufnahme nicht wiedergegeben werden. Zur Veranschaulichung dieses Bildungsmusters dient die folgende Skizze. (siehe Abb. 20)

Das gleiche Phänomen tritt ebenso, wie Abb. 19b zeigt, an Systemen paralleler Wasserkanäle auf. Offenbar wird durch solche Deformationen pro Volumeneinheit des Randes eine Oberflächenvergrößerung der den Randbereich konstituierenden Membranen verursacht. Das zick-zack-Muster ermöglicht so die teilweise Füllung der Wasserkanäle durch Lecithin.

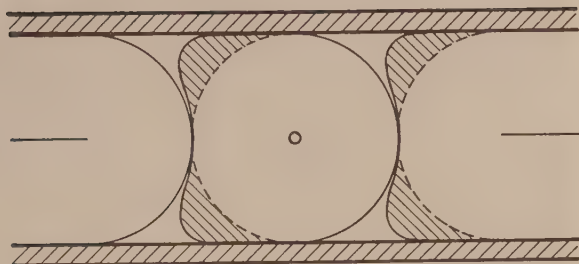


Abb. 20: Schnitt durch eine Sequenz äquidistanter Strukturen an einer Stelle maximaler Deformation. Die waagerechten Linien geben die Mitte des Vielschichtsystems wieder. Die schraffierten Flächen sollen die durch die Ausstülpungen eingenommenen Bereiche des Wasserkanals verdeutlichen.

Wie die schematische Darstellung in Abb. 20 verdeutlichen soll, füllen die dort skizzierten Ausstülpungen noch nicht den gesamten Querschnitt des Wasserkanals aus. Dies entspricht dem Zustand der Deformationen zu Beginn ihrer Entstehung. Die an den oberen und unteren Kammergrenzen vorgenommenen Untersuchungen ergeben indes eindeutig, daß mit stetiger Verminderung des Wassers eine stärkere Ausprägung der Deformationspaare erfolgt, wobei dann zunehmend der übrige Raum eines Wasserkanals eingenommen wird. Gleichzeitig damit erfährt das gesamte Äquidistanzmuster eine sukzessive, dem beschriebenen Deformationsprinzip unterliegende Umwandlung seiner Geometrie:

Abb. 21a zeigt eine solche, sich im weiter fortgeschrittenem Stadium des Wasserentzugs befindlichen Äquidistanzstruktur. Die stärkere Ausprägung der Deformationen sowie deren Verzweigungen (siehe unten) wird verdeutlicht durch die Photographie in Abb. 21b derselben Struktur, aufgenommen an der oberen Probenkammerbegrenzung. Anhand der weißen Linien - optisch bedingt durch noch verbliebene Wasserreste des Kanals - sind die Konturen der Deformationen gut erkennbar. (Aus Platzgründen wird auf die Wiedergabe der an der unteren Probengrenze praktisch identisch erscheinende Struktur verzichtet.)

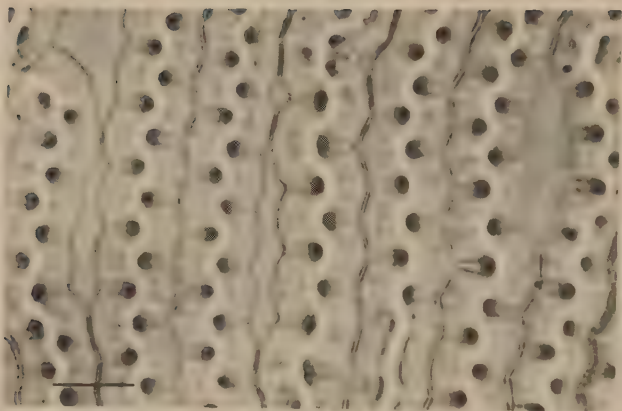


Abb. 21a: Voll entwickeltes Deformationsmuster paralleler Wasserkanäle. Der Focus befindet sich in der Probenmitte. Maßstab: 40 μm .

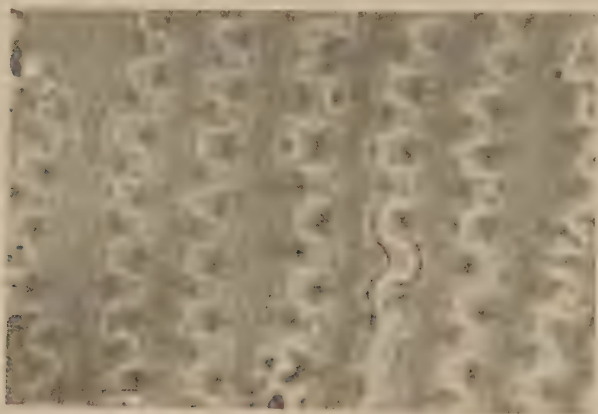


Abb. 21b: Die gleiche Struktur wie in 21a, aufgenommen an der oberen Glasbegrenzung. In der vierten Reihe von links sind Ansätze von Deformationsverzweigungen erkennbar. Probenhöhe 24 μm , Phasenkontrast. Maßstab: 40 μm .

Vergleicht man diese Konturen mit denen aus Abb. 21a, zeigt sich, daß die periodisch auftretenden Verformungen der Wasserkanäle in der Probenmitte weniger stark ausgeprägt sind. Die Periode der Deformation längs eines Zylinders entspricht etwa der Probenhöhe.

Die in den Abbildungen noch erkennbaren schwachen Schwankungen der Deformationsperioden verschwinden bei gleichmäßig fortgesetzter Reduzierung des Wasserreservoirs und die Strukturen gehen schließlich in die regelmäßigen Muster der als 'ölige Streifen' bekannten Defekte über. Die genauen Schritte dieses Übergangs sind lichtmikroskopisch schwer zu verfolgen. Die einzelnen Ausstülpungen verzweigen sich anscheinend immer weiter und die Verzweigungen sind schließlich nicht mehr optisch aufzulösen. In der Abb. 21b sind die ersten Ansätze einer Verzweigung in der Horizontalen erkennbar. Die Kenntnis der Strukturverhältnisse der hier gezeigten Verformungen genügt jedoch bereits, um die Einleitung der Bildung obengenannter Defekte hinreichend charakterisieren zu können.

Die bislang als $+\pi$ -Disklinationen interpretierte Struktur der 'öiligen Streifen' /SAU76, ASH77, KLE83/ ist im Polarisationsverfahren als helles Defektband detektierbar und läßt sich hinsichtlich dieser Nachweismethode qualitativ nicht von der durch undeformierte halbzylindrische Randkonfigurationen erzeugten Doppelbrechung unterscheiden:

- Die Geometrie beider Strukturen bedingt eine kontinuierliche, 180° umfassende Kippung der optischen Achse des homeotrop geordneten Vielschichtsystems.
- Die Kippebene ist in beiden Fällen mit dem jeweils senkrecht zur Längachse der Struktur ausgerichteten Querschnitt identisch.
- Befindet sich die Kippebene bezüglich gekreuzter Polarisatoren in einer der Normalstellung entsprechenden Orientierung, erfolgt kein Doppelbrechungseffekt.

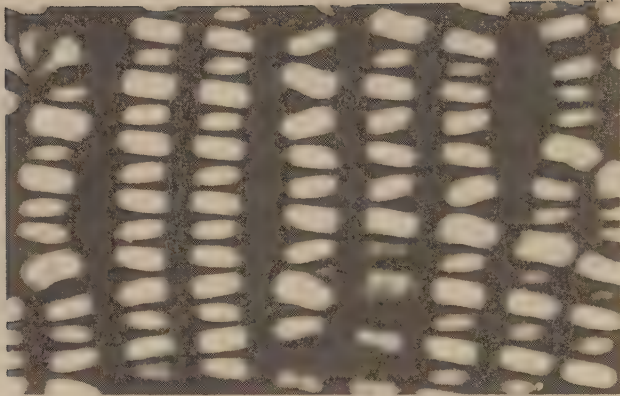


Abb. 22a: Aufnahme der in Abb. 21a dargestellten Struktur unter gekreuzten Polarisatoren. (Polarisation waagrecht und senkrecht) Maßstab: 40 μm .

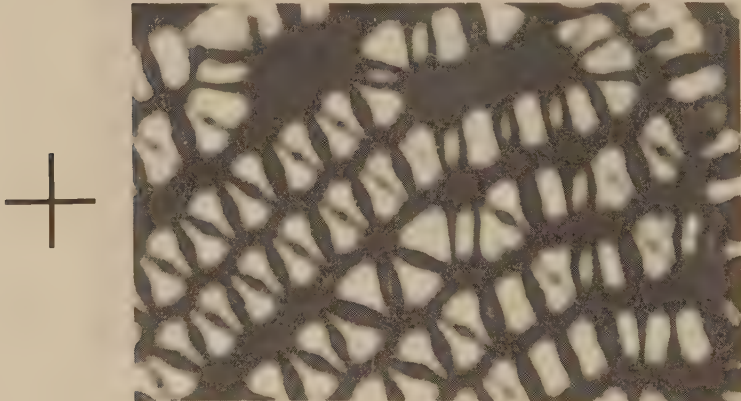


Abb. 22b: Die gleiche Struktur wie oben, um 45° gedreht. Diese Aufnahme gibt nicht exakt denselben Ausschnitt von Abb. 22a wieder. Wegen der Drehung sind hier Probenbereiche im oberen Teil der Photographie zu sehen, die in Abb. 22a nicht erscheinen. Die Verschiebung ist jedoch relativ gering. Maßstab: 40 μm .

Letzgenanntes Kriterium kann als Hilfe bei der Deutung der in Abb. 22a,b dargestellten Polarisationsmuster dienen. Diese Abbildungen zeigen die unter gekreuzten Polarisatoren aufgenommene Struktur aus Abb. 21.

Die durch das Kreuz markierte Stellung der Polarisatoren ist für beide Aufnahmen identisch. In Abb. 22b ist die Probe gegenüber ihrer ursprünglichen Position (vergl. Abbn. 21a, 22a) um 45° gedreht. Die Objektebene befindet sich in der Probenmitte. Der Vergleich der Abbn. 21a und 22a zeigt, daß jeweils eine in der letzteren Aufnahme von oben nach unten verlaufende Balkenreihe von zwei sich gegenüberliegenden deformierten halbzyklindrischen Rändern gebildet wird. (Die etwa diagonal mit alternierender Richtung die einzelnen Balken durchlaufende Linie des Wasserkanals ist in den Aufnahmen überblendet.) In dieser Probenstellung (Abb. 21a) wird die Doppelbrechung ausschließlich durch die periodisch sich ändernde Orientierung der Deformationsflanken verursacht. In der um 45° gedrehten Probe durchlaufen die Flanken gerade die Normalstellung und tragen somit nicht zur Doppelbrechung bei; diese erfolgt in diesem Fall in den Strukturbereichen mit maximaler bzw. minimaler Deformation. Da sich die senkrecht zum Wasserkanal verlaufenden Querschnitte der Deformationmaxima von denen der -minima hinsichtlich ihrer lamellaren Konfiguration unterscheiden, sind deren Beiträge zur Doppelbrechung voneinander verschieden: ein in Abb. 21a erscheinender Balken nimmt hier eine Keilform an.

Um zu zeigen, daß die in den Defektbändern der 'öligen Streifen' auftretenden transversalen Dunkellücken durch Deformationen hervorgerufen werden, die in ihrem strukturellen Aufbau mit dem der oben dargestellten Äquidistanzverformungen übereinstimmen, sei abschließend in Abb. 23 die Polarisationsaufnahme einer 'echten' Defektstruktur gezeigt, deren Entstehung in diesem Fall nicht durch Wasserentzug induziert wurde. Der Wasseranteil dieser Probe beträgt ca. 40 vol.%. An den Orten, in denen die Längsachsen der Defekte die Diagonalstellung ein-

nehmen, tritt die aus Abb. 22a bekannte zick-zack-Formation der einzelnen Defektglieder auf. Bei Richtungsänderung der Längsachsen erfolgt ein schrittweiser Übergang in die Balkenform. Dies kann deutlich am Verlauf der drei oberen Bänder verfolgt werden. Derartig gute Auflösungen der Strukturelemente dieser 'echten' Defekte gelingen nur bei sehr dünnen Proben, möglicherweise ist dies der Grund, warum bisher diese spezifische zick-zack-Struktur nicht beobachtet wurde.



Abb. 23: Polarisationsaufnahme einer 'echten' Defektstruktur. Der Wassergehalt beträgt etwa 40 vol.%. Die Periode der Deformationselemente stimmt exakt mit der Probenhöhe $D = 5 \mu\text{m}$ überein. Maßstab: $20 \mu\text{m}$.

Die bisher vertretene Annahme, die periodischen Defektbandunterbrechungen seien bedingt durch Disklinationen, an die Reihen fokal-konischer Domänen gekoppelt sind /RAU76/, darf aufgrund der in diesem Kapitel ausgeführten Beobachtungen in Zweifel gezogen werden. Vielmehr scheint hiernach sicher zu sein, daß die im Polarisationsverfahren erscheinenden Transversalmuster ('Balken' und 'Keile') auf eine - je nach Wassergehalt der Probe - unterschiedlich stark ausgeprägte, wellen-

förmige Lamellenkonfiguration mit signifikanter Periodizität zurückzuführen ist. Zu einer ähnlichen Schlußfolgerung gelangen auch Schneider et al. anhand ihrer an hydratisiertem DPPC durchgeführten Strukturuntersuchungen /SCH84/, deren Ergebnisse weniger vollständig sind aber deren Vorstellung von den "öiligen Streifen" weitgehend mit unseren übereinstimmt.

Die oben erwähnten Deformationsverzweigungen deuten darauf hin, daß die 'öiligen Streifen' eine sehr komplizierte Feinstruktur besitzen könnten, deren Beschaffenheit möglicherweise der Grund dafür ist, daß diese Defekte bekanntlich sehr schwer ausheilen. Im Falle der hier hauptsächlich untersuchten Deformationstypen (Abbn. 19, 21, 22) läßt sich experimentell die vollständige Rückbildung der periodischen Deformationen einfach dadurch erreichen, indem der Probe wieder (sehr vorsichtig) Wasser zugeführt wird. Die Deformationen erfahren dabei eine zunehmende Glättung bis schließlich der ursprüngliche geometrische Zustand der Äquidistanzstrukturen wieder hergestellt ist.

V.3.3 Die Fortsetzung der Quellentwicklung

Die sich während des weiteren Quellverlaufs ergebenden Strukturänderungen der im Wasserüberschuß wieder ausgeglätteten Äquidistanzmuster weisen keinerlei Merkmale auf, die auf eine vorher erfolgte Quellunterbrechung hindeuten würden. Abgesehen von der durch den Wasserentzug verursachten zeitlichen Verzögerung des Quellvorgangs läßt sich bei dessen Fortführung die Strukturentwicklung der Äquidistanzen - unabhängig von deren Vorgeschichte - durch drei charakteristische, zeitlich aufeinanderfolgende Quellstadien beschreiben.

I Die bereits bei Erreichen des quasi-statischen Zustands (ca. 12 - 18 h nach Quellbeginn) bemerkbaren Tendenz einer eintretenden lateralen Verbreiterung der Zylinder setzt sich nun verstärkt fort und kennzeichnet die nächstfolgende, sich über mehrere Tage erstreckende Veränderung der Strukturgeometrie. Dabei nehmen die Querschnitte der Zylinder näherungsweise

se ein elliptisches Profil an, dessen Breite (in der Probenmitte) nach 60 - 80 h (vom Zeitpunkt des Quellbeginns an gerechnet) etwa das 2 bis 3-fache des ursprünglichen Zylinderdurchmessers betragen kann. Auch diese Zunahme unterliegt ebenso wie die des longitudinalen Zylinderwachstums merklichen Unregelmäßigkeiten; die Zahlenangaben stellen Durchschnittswerte dar.

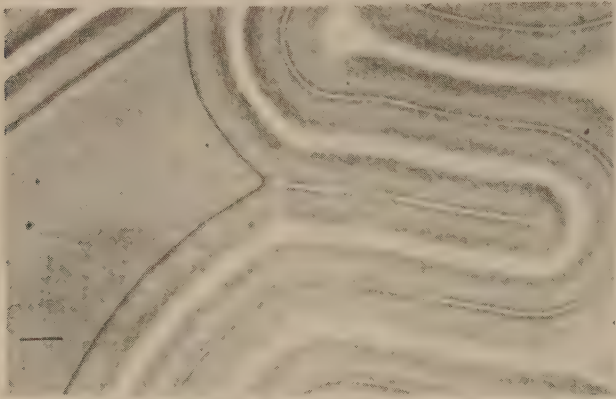


Abb. 24: Phasenkontrastaufnahme einer Äquidistanzstruktur 80 h nach Quellbeginn. Der Zylinderdurchmesser ist auf mehr als das doppelte seiner ursprünglichen Größe angewachsen. Objektebene ist die Probenmitte. Wie in Abb. 17 ist auch hier der typische Faltungsmechanismus, der zur Zylinderbildung führt, erkennbar. Links im Bild befindet sich die geordnete L_α -Phase. Die dünnen hellen Linien in der Mitte der Äquidistanzstrukturen sind deren Wasserkerne, die dickeren, ebenfalls hell erscheinenden Linien markieren die Bereiche der Wasserkanäle. Die Granulation der Äquidistanzstruktur wird durch Membranfluktuationen verursacht, die zu diesem Zeitpunkt bereits im gesamten Querschnitt der Strukturen auftreten. Die Probenhöhe beträgt 20 μm . Maßstab: 20 μm .

Mit dieser Verbreiterung nimmt auch die im Interferenzverfahren an den Glasbegrenzungen nachweisbare Kontaktfläche der Membranen deutlich zu. Ihre Breite kann sich zu diesem Zeitpunkt bereits bis auf eine etwa der Probenhöhe entsprechenden Größe ausgedehnt haben. Als Folge der sich während des quasistatischen Zustands immer stärker geltend machenden Membranfluktuationen sind die zuvor statischen Interferenzstreifen nunmehr sämtlich verschwunden.

Während die Detektion der Fluktuationen im Interferenzverfahren auf die planaren Kontaktflächen zwischen Membran und Glas beschränkt bleibt, liefert die Dunkelfeldbetrachtung entsprechende Hinweise über die im inneren Bereich der Äquidistanzstrukturen erfolgende Zunahme des Membranabstands. Insbesondere läßt sich damit die zur Strukturverbreiterung zeitlich parallel verlaufende Weitung des Wasserkerns verfolgen. Letzteres Phänomen ist auch aus der obigen Abbildung ersichtlich. Diese Phasenkontrastaufnahme vermittelt zudem einen (leider nur statischen) Eindruck von den Membranfluktuationen, die in diesem Quellstadium im gesamten Querschnitt der Äquidistanzen auftreten und ihnen die in der Photographie deutlich erkennbare Granulation verleiht. (Im Dunkelfeld erscheint diese Granulation als eindrucksvolles Flimmern.)

II Die darauf folgende, etwas drastischere Strukturänderung kennzeichnet den instabilen Charakter der Äquidistanzstrukturen: Die verbreiterten Zylinder zeigen immer häufiger die Tendenz, sich an ihren Enden derart stark auszuweiten, daß zunächst kleinere L_{α} -Gebiete gebildet werden, die ebenso wie die Zylinder die gesamte Probenhöhe ausfüllen. Die Randbereiche dieser neu gebildeten sogenannten sekundären L_{α} -Phase sind in ihrem lamellaren Aufbau mit den noch vorhandenen Bereichen der primären L_{α} -Phase - so seien die Bereiche bezeichnet, denen die Äquidistanzen entstammen - identisch. Ein Beispiel, das diese Strukturumbildung verdeutlichen soll, zeigen die folgenden Abbildungen.

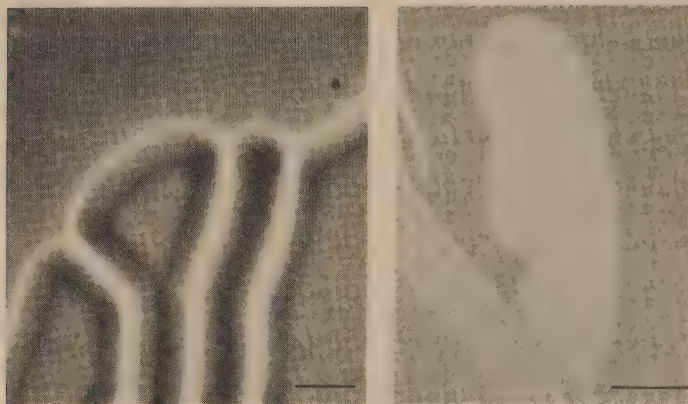


Abb. 25a,b: Beginn der Umbildung zur sekundären L_{α} -Phase (a). Das freie Wasser befindet sich in der oberen Bildhälfte. Phasenkontrastaufnahme, vom Monitor abphotographiert. Die Probenhöhe beträgt ca. 10 μm . Maßstab: 20 μm . In (b) ist ein ausgedehnteres L_{α} -Gebiet dargestellt. Die Gebietsvergrößerung erfolgt sehr langsam und kennzeichnet den weiteren Verlauf der Quellentwicklung. Fluoreszenzaufnahme. Maßstab: 100 μm .

Beruhete das Zustandekommen der Zylindergeometrie auf einer Faltung der halbzyklindrischen Randzone, führt hier die Trennung der Halbzyklinder zur Entstehung der sekundären L_{α} -Phase. Dabei findet in der Entfaltungsregion die Gabelung der Wasserkernlinie statt.

Die zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Messungen der Fluoreszenzintensität ergeben, daß die Lecithindichte der sekundären L_{α} -Phase gegenüber der primären im allgemeinen schwach verringert ist. Genauere Angaben darüber sind im nächsten Abschnitt dieses Kapitels enthalten.

Häufig ist zu beobachten, daß die Umrisse dieser neu gebildeten L_{α} -Gebiete eine unregelmäßig wellenförmige Gestalt anneh-

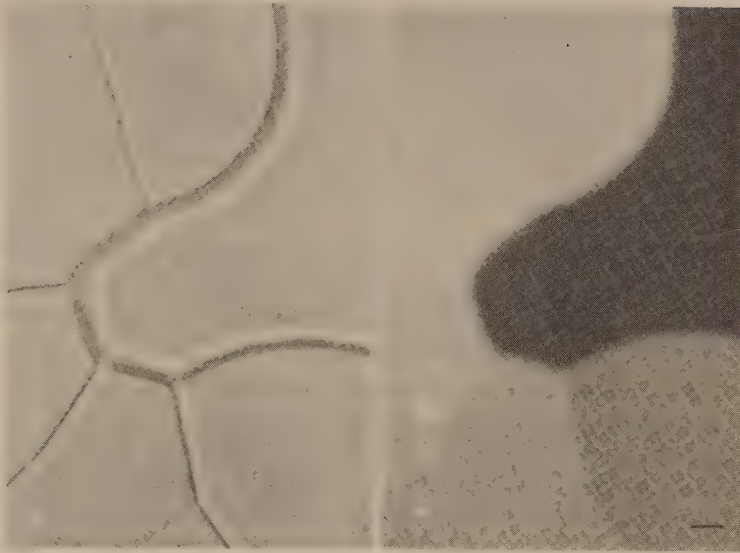


Abb. 26a,b: Phasenkontrast- (a) und Fluoreszenzaufnahme (b) einer sekundären L_{α} -Phase im III. Quellstadium. Der schwarze Bereich kennzeichnet das freie Wasser. Die in der Fluoreszenzaufnahme deutlich erkennbaren graduellen Abstufungen der Intensität korrespondieren mit den durch die smektischen Dislokationen markierten Bereichen der L_{α} -Phase, die im gesamten Probenausschnitt die volle Kammerhöhe ausfüllt. Die Schwankungen der Lecithindichte sind in diesem Beispiel extrem stark. Der Focus befindet sich in der Probenmitte, die Probenhöhe beträgt 18 μm . Anhand der Phasenkontrastaufnahme wird besonders gut deutlich, daß die Entstehung der Dislokationen durch Ablösung von Membranen vom inneren Randbereich der L_{α} -Phase verursacht wird. Am äußeren Rand, in der wässrigen Phase, entstehen an solchen Strukturen häufig Vesikeln. (siehe dazu Kap. V.3.5). Maßstab für beide Aufnahmen: 20 μm .

men. Das deutet darauf hin, daß in diesem Stadium des fortwährenden Quellens die Bildung weiterer Randzonen energetisch immer noch begünstigt erscheint. In der Tat können aus solchen

"Ablegern" der ursprünglichen L_{α} -Phase nach dem bekannten Bildungsprinzip wiederum Äquidistanzstrukturen hervorgehen, deren Ausprägung in diesem Fall jedoch von Anfang an extrem langsam verläuft. Im Laufe der Zeit dehnen sich die Bereiche der sekundären L_{α} -Phase weiter aus und ihre Umrisse nehmen allmählich eine glattere Kontur an. Etwa 5 - 7 Tage nach Quellbeginn ist zu erkennen, daß nun auch keine weitere Neubildung von Äquidistanzen mehr erfolgt.

III Die in den hier beschriebenen Experimenten letzte, auffällige Quellerscheinung besteht ausschließlich in der fortgesetzten, sehr langsam verlaufenden Expansion der sekundären L_{α} -Phase. Verfolgt man diesen Vorgang über einen längeren Zeitraum von etwa weiteren 7 Tagen, wird deutlich, daß die Lecithindichte starken Schwankungen unterliegt, sich jedoch im Mittel in signifikanter Weise ständig verringert. Den Aufnahmen aus Abb. 26a,b ist zu entnehmen, daß die Bereiche mit unterschiedlicher Lecithindichte durch die oben erwähnten smektischen Dislokationen begrenzt werden.

V.3.4. Ergebnisse der Lecithindichte-Messung

Um die Abnahme der Lecithindichte in der L_{α} -Phase im Verlauf der Zeit erfassen zu können, mußten zuvor Eichmessungen an Vielschichtsystemen mit bekanntem Wassergehalt durchgeführt werden. Eine zwanzigstündige Lagerung des für die Eichproben bestimmten Lecithins (100 μm dicke, auf Objektträger aufgetragene Schichten) bei 95°C im Vakuum ($< 10^{-3}$ atm) gewährleistete die Dehydration der Substanz auf einen Ausgangszustand mit einem Wasseranteil von ca. 1 vol.% /POW77/. Von dem so behandelten Material wurden Probenserien hergestellt, die unterschiedlich stark hydratisiert und als Eichproben in verschiedener Dicke (8 - 22 μm) verwendet wurden. Der Hydrationsgrad konnte durch Wägung mit einer Genauigkeit von ± 1 % bestimmt werden und variierte über den Bereich von 5 - 44 vol.%.

Die an diesen Proben durchgeführten Messungen der Fluoreszenzintensität - immer bezogen auf die jeweilige Probenhöhe - lieferten das Maß, mit dem die Lecithindichte der L_{α} -Phase in den aufeinanderfolgenden Quellstadien bestimmt werden konnte. (Ein methodisch ähnliches Verfahren verwendeten Chan und Webb /CHA81/, um die Ausheilung von smektischen Dislokationsstufen in hydratisiertem Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) nachzuweisen). - Die den Lecithindichtewerten jeweils entsprechenden Membranabstände lassen sich dann berechnen, wenn man die Membrandicke kennt. Den im folgenden (siehe Tab. II) angegebenen Abständen liegt eine Dicke von 35.5 Å zugrunde, d.h. der von Le Neveu et al. /NEV77/ für den sogenannten Gleichgewichtsabstand ermittelte Wert.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf geordnete Vielschichtsysteme, deren Wassergehalt vor Quellbeginn 10 - 20 vol.% beträgt und die bei einer Probendicke von $D = 20 \mu\text{m}$ etwa 10 % des gesamten Kammervolumens einnehmen.

i) 12 h nach Einleitung des Quellvorgangs ist die Lecithindichte der L_{α} -Phase im Grenzbereich des freien Wassers bereits auf 60 vol.% abgesunken und verringert sich nach weiteren 12 h bis auf 55 vol.%. Die durch lokale Schwankungen der Lecithindichte hervorgerufenen Abweichungen von diesen Werten können bis zu 15 vol.% ausmachen.

ii) Bei der Entstehung der sekundären L_{α} -Phase, also 2 bis 3 Tage nach Quellbeginn, hat die Lecithinkonzentration in diesen Bereichen im Durchschnitt auf 40 vol.% abgenommen.

iii) Nach 5 bis 7 Tagen, wenn die sekundäre L_{α} -Phase keine weiteren Äquidistanzstrukturen mehr bildet, beträgt der ihre Dichte bestimmende Lecithinanteil ca. 28 vol.%.

iv) Im letzten oben aufgeführten Quellstadium III ist die Verdünnung der expandierten sekundären L_{α} -Phase schließlich bis auf 20 vol.% vorgeschritten.

In der folgenden Übersichtstabelle sind diese Daten mit den entsprechenden Membranabständen dargestellt.

Wenngleich diese Daten nur eine relativ grobe Klassifizierung des Quellverlaufs von EL in Wasserüberschuß darstellen, ergibt sich aus ihnen doch der eindeutige Hinweis, daß die Membranen des geordneten Vielschichtsystems - zumindest für den hier in Betracht gezogenen Zeitraum der Quellentwicklung - keinen bevorzugten Gleichgewichtsabstand einnehmen.

An einigen Proben wurde die Quellentwicklung 6 Wochen lang verfolgt. Nach dieser Zeit füllte das gequollene Lecithin das gesamte restliche Kammervolumen aus und die früher gebildeten Äquidistanzstrukturen waren fast völlig verschwunden. Zu diesem Zeitpunkt ist es dann auch kaum noch möglich, zwischen sekundärer und primärer L_{α} -Phase zu unterscheiden.

Tabelle II

Quellstadium	I	II	III
Zeit nach Quellbeginn in Tagen	1	2 - 3	5 - 7
Strukturmerkmale	Bildung von Äquidistanzstrukturen	Entstehung der sekundären L α -Phase	Beendigung der Äquidistanzbildung
			Expansion der sekundären L α -Phase, Dislokationen
Lecithindichte in vol. %	56	40	28
Membranperiode d/ $\text{\AA}$	63	88	126
Membranabstand d _w / $\text{\AA}$	27.5	53	91
			142

Tabelle II: Ergebnisse der Lecithindichtemessungen. Die in der ersten Spalte aufgeführten Werte sind praktisch identisch mit denjenigen, die von Le Neveu et al. mittels Röntgenstreuung an Lecithin-Wasser-Dispersionen gemessen wurden /NEY77/. Anhand dieser Daten sowie der sich daraus ergebenden Membrandicke ($d-d_w=35.5 \text{ \AA}$) können die übrigen Werte für die Membranperioden bzw. Membranabstände aus den gemessenen Größen der Lecithindichte berechnet werden.

V.3.5 Die Entstehung von Vesikeln

Die in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Untersuchungen haben als wichtiges Ergebnis gezeigt, daß die im Laufe des Quellvorgangs sich entwickelnden Strukturumbildungen zu einer Konzentrationsabnahme des Lecithins in der L_α -Phase führen. War dies in erster Linie anhand der smektischen Dislokationen des Vielschichtsystems zu verfolgen, soll hier nun ein anderes, etwas weniger deutlich sichtbares Quellphänomen beschrieben werden, das ebenfalls zur Verdünnung der L_α -Phase beiträgt.

In vielen Quellexperimenten wurde wiederholt bemerkt, daß am Rand der L_α -Phase (primär wie auch sekundär) bzw. in deren unmittelbarer wässriger Umgebung spontane Vesikelbildungen stattfinden. Ein typisches Bild dieser Erscheinung vermitteln die Abb. 27a,b. (Auch in Abb. 26a ist eine Vesikel zu sehen, die noch am Rand der L_α -Phase haftet.) Die Abb. 27b wurde ei-

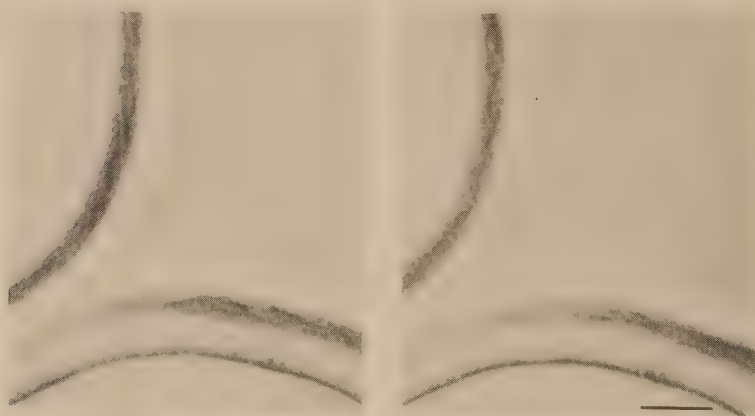


Abb. 27a,b: Phasenkontrastaufnahme einer sphärischen Vesikel, die (a) am Rand der L_α -Phase haftet und sich einige Stunden später (b) isoliert im freien Wasser befindet. Die Probenhöhe beträgt 30 μm . Maßstab: 20 μm .

nige Stunden später aufgenommen. Hier hat sich die Vesikel bereits deutlich vom Rand gelöst.

Derartige Vesikeln traten oft unvermittelt ins Bild und es war wegen der geringen Probenhöhen ausgeschlossen, sie vorher - da vielleicht nicht im Focus - übersehen zu haben. Ein Herandriften dieser Vesikeln aus anderen Probenbereichen konnte ebenso ausgeschlossen werden. Die naheliegende Vermutung, die Entstehung dieser Vesikeln könnte auf einen bis dahin unbemerkten Vorgang der Membranabsonderung von der L_{α} -Phase zurückzuführen sein, wurde durch folgende Beobachtung bestätigt: Bei genauer Untersuchung des Randbereichs der L_{α} -Phase zeigte sich, daß von der Mitte des Randes des geordneten Vielschichtsystems sehr dünne, meist unilamellare zylindrische Membranröhrchen in



Abb. 28: Zwei Membranröhrchen, die vom Rand der L_{α} -Phase in das freie Wasser abquellen. Daneben befindet sich eine längliche Vesikel, die vermutlich aus der Umbildung derartiger Zylinder entstanden ist. Der Radius der Zylinder ist optisch nicht auflösbar. Anfangsphase des Quellstadiums II. Maßstab: 40 μm .

das freie Wasser 'wachsen'. Dieser relativ schwer zu detektierende Vorgang tritt besonders häufig während der beiden letzten Quellstadien II und III auf.

Obwohl die Radien r dieser Membranzylinder verhältnismäßig klein waren ($r \lesssim 1 \mu\text{m}$), ließ sich dennoch eindeutig feststellen, daß ihre Größe - unabhängig von der Lamellenzahl - in auffälliger Weise variierte, wobei die Radien der zeitlich später entstandenen Zylinder aus Stadium III stets größer waren als die derjenigen aus Stadium II. Letztere konnten bei Bildungsbeginn optisch kaum aufgelöst werden; ihre Anfangsgröße $r \lesssim 0.3 \mu\text{m}$ darf daher nur als Abschätzung gewertet werden. Die vorangegangene und die folgende Abbildung zeigen derartige Membranröhrchen aus verschiedenen Quellstadien.



Abb. 29: Phasenkontrastaufnahme des L_α -Randes mit unilamellaren Zylindern. Die Granulation des Randes wird durch die fluktuierenden Membranen verursacht. Spätphase des Quellstadiums III. Die Lecithindichte in der Umgebung dieses Randbezirks schwankte zwischen 14 und 18 vol.%. Die Probenhöhe beträgt $30 \mu\text{m}$. Maßstab: $20 \mu\text{m}$.

Die Längenzunahme dieser Zylinder war unregelmäßig und erfolgte vorübergehend mit ca. $10 \mu\text{m h}^{-1}$. Die Radien vergrößerten sich mit zunehmender Quelldauer, also mit abnehmender Lecithindichte, jedoch war eine mehrtägige Verfolgung dieser Entwicklung an einzelnen Exemplaren äußerst schwierig, da sich viele der Membranröhrchen während dieses Beobachtungszeitraums abrupt in Vesikeln umformten.

In einigen Fällen wurde bemerkt, daß sich diese Umwandlungen gerade dann ereigneten, wenn bestimmte (optisch sehr schwer zu erkennende) Defektlinien, die an der oberen bzw. unteren Glasbegrenzung des Vielschichtsystems lokalisiert werden konnten, den Rand der L_{α} -Phase erreichten. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Dislokationen (siehe z.B. Abb. 26a) bewegten sich besagte Linien - Ränder einzelner oder gefalteter Membranen - gerade in die entgegengesetzte Richtung zum freien Wasser hin. Dieser Vorgang war zumeist mit einer gleichzeitigen Längenzunahme der in das freie Wasser abquellenden Membranröhrchen verbunden. - Faßt man diese Beobachtungen zusammen, ergibt sich daraus ein Bild, das einen möglichen - wenn auch speziellen - Mechanismus der Vesikelentstehung illustriert, der im wesentlichen auf einem Herausgleiten der äußersten Membran vom Vielschichtsystem und der damit korrespondierenden Bildung dünner Lecithinzylinder beruht. Aus dem Radius der Zylinder läßt sich unter Verwendung des bekannten Moduls der Krümmungselastizität die abstoßende Kraft zwischen den Membranen im Vielchichtsystem berechnen /HAR84/. Dies wird im folgenden Kapitel, Abschnitt 4 näher ausgeführt.

Abschließend sei hingewiesen auf einen weiteren interessanten Effekt, der bei genügend dünnen Membranröhrchen auftritt (zur Angabe ihrer Radien siehe unten). Wenn die dünnen Membranröhrchen lang genug werden, um signifikante Biegungsfluktuationen ausführen zu können, gelangen ihre Enden häufig an eine der Glasseiten der Probenkammer. Wenn dieser Fall eintritt, sind zwei Effekte (Adhäsion und Kohäsion) zu unterscheiden:

- i) die dünnsten Zylinder ($r < 0.5 \mu\text{m}$) haften fest am Glas (Adhäsion). Ein typisches Merkmal extrem dünner Zylinder zeigt Abb. 30: Sämtliche Membranröhrchen haften unverrutschbar am Glas und zeigen die Tendenz, während ihrer Längenzunahme Verzweigungen zu bilden. Die Verzweigungswinkel betragen häufig 120° . Die Membranen haben hier völlig ihre sonst so auffällige "fließende Geschmeidigkeit" eingebüßt und bilden ein eher als "eingefroren" zu bezeichnendes Filigranmuster.



Abb. 30: Filigranmuster von dünnen Membranzylindern, die fest am Glas haften. Die Verzweigungswinkel betragen meist 120° . Phasenkontrastaufnahme. Die Durchmesser der Zylinder sind optisch nicht auflösbar. Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

- ii) Zylinder mit etwas größeren Radien $r \approx (0.5 - 1.5) \mu\text{m}$ haften ebenfalls am Glas; sie können jedoch am Glas entlang verrutschen und ordnen sich - offenbar als Folge einer gegenseitigen Kohäsion - vorzugsweise parallel zueinander an. (siehe Abb. 31a,b)

Derartige Parallel-Anordnungen wie in Abb. 31b wurden bei Zylindern mit größeren Radien ($1.5 \mu\text{m} < r < 3 \mu\text{m}$) nicht beobachtet. Auch das Adhäsionsverhalten ist bei ihnen nicht mehr so stark ausgeprägt. Mittels der Interferenzmethode konnte nachgewiesen werden, daß sie nur noch teilweise am Glas haften. Die zu den hier dargestellten Hafteffekten bisher durchgeführten Beobachtungen ergeben, daß für Zylinder mit Radien $r \gtrsim 3 \mu\text{m}$ keine Adhäsion mehr erfolgt.



Abb. 31a,b: Haftung eines Membranzylinders an einer Glasseite der Probenkammer. Der Zylinder Kann am Glas entlang verrutschen (a). Einige Stunden später (b). Phasenkontrastaufnahme. Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

Obige Hafteffekte wurden von Helfrich /HEL84b/ theoretisch beschrieben und diskutiert. Sie sind Beispiele dafür, daß die Stärke der abstoßenden Undulationskräfte durch die einengende Geometrie der Zylinder herabgesetzt wird. Anscheinend überwiegen die van der Waals-Kräfte für entsprechend kleine Radien, so daß dann Adhäsions- und Kohäsionseffekte auftreten können.

(Sornette und Ostrowski zeigen in einer theoretischen Arbeit, daß ungespannte (sphärische) Vesikeln nur dann aneinander haften, wenn sie "klein genug" sind /SOR84/).

VI. Diskussion und Interpretation

VI.1 Die den Quellvorgang beeinflussenden Wechselwirkungen

Unsere Experimente mit geordneten Vielschichtsystemen ergeben generell, daß diese im Kontakt mit freiem Wasser instabil werden und in charakteristischer Weise bestimmte Folgen von Quellstrukturen durchlaufen. Die einzelnen Strukturumwandlungen sind begleitet von einer kontinuierlichen Verminderung der Lecithindichte. Die Messungen der Lecithindichte ergeben auch keinerlei Anhaltspunkte dafür, daß sich während des Quellvorgangs eine Art von Phasenscheidung ereignet. Die stetige Abnahme der Lecithinkonzentration und das offensichtliche fehlen einer Lücke im Bereich der in Frage kommenden Membranperioden ($60 \text{ \AA} \lesssim d \lesssim 200 \text{ \AA}$) sind eindeutige Anzeichen dafür, daß die Wechselwirkung der Membranen nicht nur für alle Abstände insgesamt abstoßend ist, sondern auch mit dem Membranabstand monoton abnimmt. Insofern kann das Vielschichtsystem mit einem van der Waals-Gas verglichen werden, das sich oberhalb der kritischen Temperatur befindet.

Mit den in Kap. IV gemachten Voraussetzungen lassen sich vier Kräfte unterscheiden, die in einem Vielschichtsystem zwischen benachbarten Membranen wirken:

I Abstoßende, exponentiell abfallende Hydratationskräfte, die hier mit Bezug auf die in Kap. IV erläuterten Daten für EL in der Form

$$f_h = 1.0 \cdot 10^{11} e^{-d_w/1.93 \text{ \AA}} \text{ dyn cm}^{-2} \quad (36)$$

dargestellt werden.

II Anziehende van der Waals-Kräfte. Durch Anpassung des bei $d_w = 27.5 \text{ \AA}$ experimentell bestimmten Vorfaktors (siehe Kap. IV) auf kleinste Abstände, konkret durch die Multiplikation $1.15 \cdot C(d_w = 27.5 \text{ \AA}) / \text{NIN70/}$ erhält man den Ausdruck

$$f_{vdW} = -(1.2 \dots 2.0) \cdot 10^{-15} \frac{\text{erg}}{d_w^3}, \quad (37)$$

der nur wenig von dem rein theoretischen Resultat ($2.9 \cdot 10^{-15} \text{ erg}/d_w^3$) letztzitatierter Arbeit von Ninham und Parsegian abweicht.

Da in unseren Experimenten niemals eine Einschränkung der Quellentwicklung beobachtet wurde, darf bezweifelt werden, ob die bisher unter Berufung auf die experimentellen Ergebnisse der Röntgenmessungen an ungeordneten Lecithin-Wasser-Dispersionen angestellten Schlußfolgerungen - Existenz eines Gleichgewichtsabstands - in dieser allgemeinen Bedeutung auf das Quellverhalten von geordneten Membransystemen einfach übertragbar sind. Schon die Streuung des experimentell bestimmten Wertes $C(d_w)$ kann möglicherweise auf eine merkliche Störung des Gleichgewichts durch Undulationskräfte hindeuten. Es soll hier nicht näher untersucht werden, inwieweit van der Waals-Kräfte in der Lage sein können, in ungeordneten Systemen zu dominieren. Immerhin scheint dies möglich zu sein, wenn das Vielschichtsystem - aufgrund der verwendeten Präparationsmethoden - in Form von sehr kleinen Liposomenstrukturen vorliegt, was wegen der eingegengten Geometrie eine entsprechende Unterdrückung der Membranundulationen zur Folge hätte. Daher wird für die weitere Diskussion angenommen, daß der korrekte numerische Wert des Vorfaktors aus Gl. (37) eher der oberen Grenze des Intervalls zuzuordnen ist.

III Abstoßende Undulationskräfte, deren Stärke in Abhängigkeit vom Abstand der Membranen bisher noch nicht gemessen wurde, die jedoch - der Theorie zufolge /HEL78/ - ausreichen, um eine Abstandsvergrößerung (Separation) zwischen spannungsfreien unendlich ausgedehnten Lecithinmembranen herbeiführen zu können /HEL84a/. (Ein Beispiel einer derartigen Separation zeigen die Abb. 27a,b)

Mit $kT = 4 \cdot 10^{-14}$ erg (Zimmertemperatur) und $\kappa = 2 \cdot 10^{-12}$ erg erhält man für die Undulationskräfte nach Gl. (12) den Ausdruck

$$f_{\text{und}} = 1.6 \cdot 10^{-15} \frac{\text{erg}}{d_{\text{eff}}^3} \quad (38)$$

Außer der nahen Übereinstimmung der numerischen Vorfaktoren von f_{und} und f_{vdW} ist noch folgendes zu beachten. Da die Membranundulationen zu schwach sind, um in die Hydrathülle der Membranen einzudringen, ist der effektive Membranabstand d_{eff} um einen gewissen Betrag kleiner als der Membranabstand d_w . Der Unterschied zwischen beiden Abständen kann für größere Abstände näherungsweise gerade $d_w - d_{\text{eff}} = 27.5 \text{ \AA}$ ausmachen, sollte sich aber verringern, sobald der Membranabstand in die Nähe des sog. Gleichgewichtsabstands ($d_w \lesssim 27.5 \text{ \AA}$) rückt. Wichtig ist, daß wegen $d_{\text{eff}} < d_w$ f_{und} gegenüber f_{vdW} deutlich überwiegen kann. Bei größeren Abständen hat der Unterschied zwischen d_w und d_{eff} weniger Bedeutung. Dafür nimmt der Vorfaktor von f_{vdW} bei größeren Membranabständen d_w ab (siehe oben), was wiederum die Undulationskräfte begünstigt.

IV Für die abstoßenden elektrostatischen Kräfte zwischen geladenen Lecithin-Doppelschichten erhalten Cowley et al. /COW78/ durch Lösung der diesem Problem entsprechenden Poisson-Boltzmann-Gleichung den Ausdruck

$$f_{\text{es}} = \frac{kT}{A} \frac{2X}{d_w} \frac{q}{\tan q} \quad (39)$$

mit

$$q \tan q = \frac{X}{kT} \frac{e^2 d_w}{A \epsilon} \quad (40)$$

Unter der Voraussetzung, daß die im wässrigen Medium vorhandenen Ionen ihre Gegenionen ausschließlich auf der Membran haben, können mit Hilfe des Parameters q ($0 < q < \pi/2$) als obere Grenze für f_{es} zwei asymptotische Näherungen angegeben werden:

Bei hinreichend kleinen Membranabständen und Ionenkonzentrationen pro Einheitsfläche folgt aus Gl. (39) für $q \rightarrow 0$ die Beziehung

$$f_{es} = \frac{2X}{A} \frac{kT}{d_w} \quad (41)$$

mit X als Molfraktion der dissoziierten Ionen und $A \approx 60 \text{ \AA}^2$ als typischen Wert für den Querschnitt eines Lecithinmoleküls.

Für hinreichend große Abstände und Ionenkonzentrationen, d.h. für $q \rightarrow \pi/2$ erhält man

$$f_{es} = \frac{\pi}{2} \frac{(kT)^2 \epsilon}{e_o^2} \frac{1}{d_w^2} \quad (42)$$

wobei $\epsilon = 80$ die DK von Wasser und e_o die Elementarladung darstellen. Das Gleichsetzen der beiden letzten Ausdrücke ergibt mit

$$d_w X = \frac{\pi}{4} \frac{kT \epsilon A}{e_o^2} \quad (43)$$

eine Beziehung, die es gestattet, den Wert von $d_w X$ zu ermitteln, bei dem der Übergang zwischen beiden Gesetzen erfolgt.

Wenn man einfachheitshalber annimmt, daß der Verlauf von f_{es} durch die Ausdrücke der Gln. (41), (42) und (43) exakt wiedergegeben wird, kann für jeden Abstand d_w eine maximale elektrostatische Abstoßung $f_{es}^{\max}$ berechnet werden. Das Maximum dieser Kraft wird gerade bei einer bestimmten Molfraktion $X_{\text{Üb}}$ erreicht, für die nach Gl. (43) der Übergang zwischen den beiden f_{es} -Gesetzen stattfindet. Die folgende grafische Darstellung gibt den Verlauf der asymptotischen Gesetze für f_{es} in Abhängigkeit von d_w wieder. In der Tabelle III sind zur Orientierung einige charakteristische Werte von $X_{\text{Üb}}$ und $f_{es}^{\max}$ als Funktionen von d_w aufgeführt.

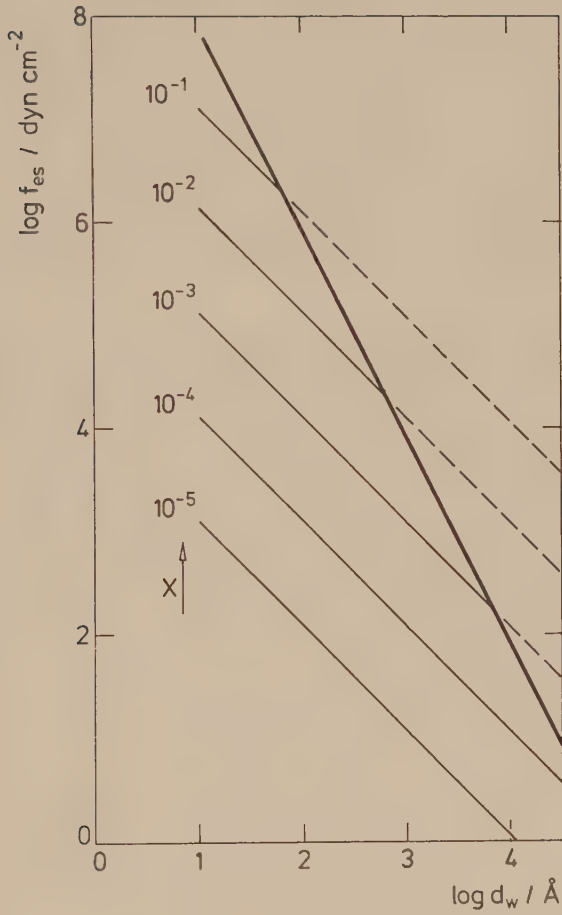


Abb. 32: Verlauf der beiden asymptotischen Gesetze für f_{es} als Funktion von d_w mit $q \rightarrow \pi/2$ (stärkere Linie) und $q \rightarrow 0$ (schwächere Linien). Als Parameter ist die jeweils entsprechende Molfraktion X der Funktion $f_{es} \sim d_w^{-1}$ aufgeführt.

Tabelle III

$d_w/\text{\AA}$	10	100	1000
$x_{\text{üb}}$	$6 \cdot 10^{-1}$	$6 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-1}$
$f_{\text{es}}^{\text{max}}/\text{dyn cm}^{-2}$	$8 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^3$

Tabelle III: Einige Werte für f_{es} , bei denen der Übergang zwischen beiden Gesetzen aus den Gln. (41) und (42) erfolgt.

Aus den Beziehungen der Gln. (41) und (42) ist ersichtlich, daß f_{es} schwächer abfällt als f_{und} und f_{vdW} . Daher könnten schon sehr geringe Verunreinigungen zu einer Dominanz der elektrostatischen Abstoßung führen, dies insbesondere bei größeren Membranabständen. (Beispielsweise nimmt f_{es} bei $d_w = 100 \text{ \AA}$ und $X = 5 \cdot 10^{-4}$ den Wert $f_{\text{es}} = 6.6 \cdot 10^3 \text{ dyn cm}^{-2}$ an, während die van der Waals-Kräfte mit $|f_{\text{vdW}}| \approx 2 \cdot 10^3 \text{ dyn cm}^{-2}$ und die Undulationskräfte mit $f_{\text{und}} \approx 4.3 \cdot 10^3 \text{ dyn cm}^{-2}$ deutlich niedriger liegen.) Da die Quellexperimente außerdem mit bidestilliertem Wasser durchgeführt werden, darf nicht erwartet werden, daß eventuell vorhandene elektrostatische Kräfte eine Schwächung durch die Abschirmung nach Debye-Hückel erfahren. (Die Debye-Länge für bidestilliertes Wasser ist von der Größenordnung $10^3 \text{ \AA}$!) In der weiteren Diskussion wird trotz der Ungewißheit über die Größe von X davon ausgegangen, daß ionische Verunreinigungen eine untergeordnete Bedeutung für das Quellverhalten der hier untersuchten Proben besitzen; zur näheren Begründung siehe Abschnitt VI.4.

VI.2 Energiebetrachtung zur Randbildung der L_α -Phase

Der Rand der geordneten L_α -Phase wird von konzentrisch gekrümmten Membranen gebildet. Bei Quellbeginn stimmen deren Membranabstände sicherlich mit denen der planar geordneten L_α -Phase überein, so daß die Randmembranen sämtlich eine halbzyklindrische Form besitzen. Eine Längerzunahme des Randes, wie sie z.B. durch die beobachtete Bildung von kompakten Lecithin-zyklindern bzw. Wasserkanälen erfolgt, sollte unter den experimentell gegebenen Bedingungen energetisch begünstigt sein:

Die halbzyklindrische Form der Randmembranen erfordert krümmungselastische Energie. Nach Gl. (2) kann die Energiedichte einer derartigen Randmembran mit

$$g_{el} = \frac{1}{2} \kappa \frac{1}{r^2} \quad (44)$$

angegeben werden, wobei r den jeweiligen Zylinderradius darstellt und $c_0 = 0$ gesetzt ist. Die krümmungselastische Energie pro Einheitslänge des Randes läßt sich dementsprechend durch

$$G_{el} = \frac{1}{2} \kappa \pi \int_{r_{min}}^{r_{max}} \frac{1}{r} dr \frac{1}{d} = \frac{1}{2} \kappa \pi \ln\left(\frac{r_{max}}{r_{min}}\right) \frac{1}{d} \quad (45)$$

ausdrücken, wobei d die Membranperiode des Vielschichtsystems angibt. Um die betreffenden Energien miteinander vergleichen zu können, sollen hier die Daten für EL beim sogenannten Gleichgewichtsabstand $d_w = 27.5 \text{ \AA}$ und $d = 63 \text{ \AA}$ verwendet werden. Für die typische Probenhöhe $D = 20 \text{ \mu m}$ beträgt die obere Integrationsgrenze $r_{max} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$. Mit $r_{min} = 10^{-7} \text{ cm}$ erhält man

$$G_{el} \approx 4 \cdot 10^{-5} \text{ erg cm}^{-1} \quad (46)$$

Die oberen und unteren Grenzen treten in Gl. (45) als Argument des natürlichen Logarithmus auf, daher ist der Einfluß von r_{max} und r_{min} auf G_{el} relativ gering.

Die Ausbildung neuen Randes ist energetisch nur dann von Vorteil, wenn dadurch die freie Energie des Vielschichtsystems herabgesetzt wird. Ein möglicher Vorgang, der die Freisetzung regelt, wäre der folgende: Durch die Netto-Abstoßung zwischen den Membranen in einem Randbereich mit vorgegebener Länge wird eine Permeation des Wassers verursacht, wodurch sich die Membranabstände vergrößern. Da die Abstoßung sehr schnell mit Zunahme des Membranabstands abnimmt, kann die gesamte Wechselwirkungsenergie vermindert werden, indem das hindurchgetretene Wasser auf einen größeren Randbereich verteilt wird. Für eine Abschätzung soll es genügen, anzunehmen, daß die gesamte Abstoßungsenergie zur Bildung eines neuen Randes verbraucht wird. Für die den Hydratationskräften entsprechende Energie pro Einheitslänge des Randes ergibt sich dann:

$$G_h = -\pi \int_{r_{\min}}^{r_{\max}} r \, dr (1.93 \text{ \AA}) (1 \cdot 10^{11} \text{ dyn cm}^{-2}) e^{-d_w/1.93 \text{ \AA}} \frac{1}{d} \quad (47)$$

und für die Undulationskräfte erhält man

$$G_{\text{und}} = -\pi \int_{r_{\min}}^{r_{\max}} r \, dr \frac{(kT)^2}{\kappa d_{\text{eff}}^2} \frac{1}{d} \quad (48)$$

Einsetzen der Werte $r_{\min} = 0$, $d_w = 27.5 \text{ \AA}$, $d = 63 \text{ \AA}$, $d_{\text{eff}} = 10 \text{ \AA}$ liefert die Resultate (für $D = 20 \text{ \mu m}$)

$$G_h = -3 \cdot 10^{-3} \text{ erg cm}^{-1}$$

sowie

$$G_{\text{und}} = -0.2 \text{ erg cm}^{-1}$$

Beide Energien können G_{el} überkompensieren, so daß die Möglichkeit des "Randwachstums" aus energetischen Gründen durchaus gegeben ist. In der folgenden Graphik sind diese Energien als Funktion des Membranabstands d_w aufgetragen.

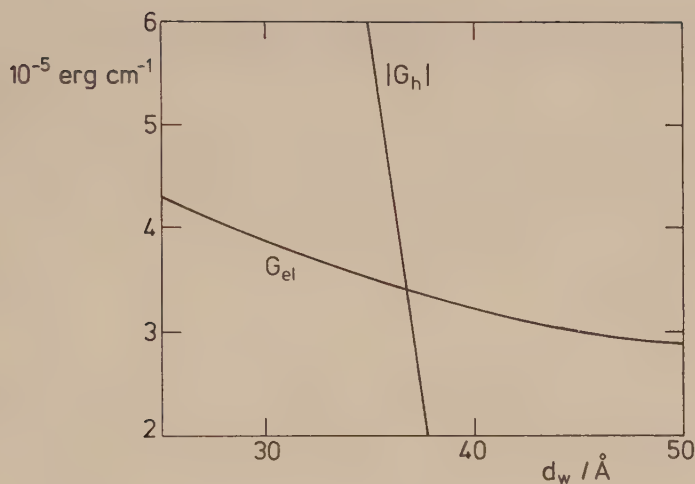


Abb. 33a: $|G_h|$ und G_{el} als Funktionen des Membranabstands d_w

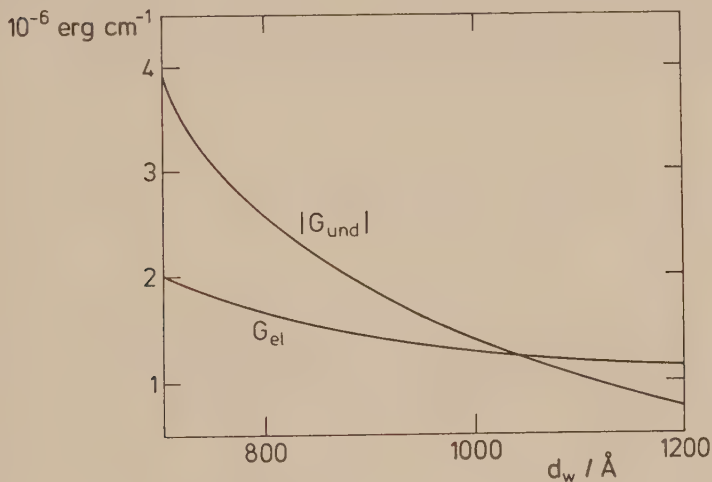


Abb. 33b: $|G_{und}|$ und G_{el} als Funktionen des Membranabstands d_w

Aus dem Kurvenverlauf ist zu erkennen, daß $|G_h|$ schon bei $d_w = 37.5 \text{ \AA}$ unter G_{el} abfällt, während der andere Fall $|G_{und}| < G_{el}$ erst bei $d_{eff} \approx d_w \approx 10^3 \text{ \AA}$ eintritt. Damit ist eine (noch ungeprüfte) Aussage darüber getroffen, bis zu wel-

chen maximalen Membranabständen der ununterbrochene Quellvorgang für Systeme der hier untersuchten Art letztlich führen kann.

Um eine Abschätzung über die dynamische Entwicklung der Randkonfiguration machen zu können, wird hier angenommen, daß die Geschwindigkeit v des durch eine Membran hindurchtretenden Wasserstroms durch die Gleichung

$$v = \frac{\alpha}{N_A} \frac{P}{kT} \Delta f \quad (49)$$

hinreichend genau beschrieben werden kann. Hier bedeuten $\alpha = 18 \text{ cm}^3$ das molare Volumen des Wassers, $P = 4 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ die Permeabilität von EL gegenüber H_2O /BOR81/ und Δf die Druckdifferenz zwischen den beiden Seiten einer Membran. N_A ist die Avogadro-Konstante. Nimmt man als Druck mit $f = 1 \cdot 10^5 \text{ dyn cm}^{-2}$ einen Wert an, der als typisch für die den 'Gleichgewichtsabstand' bestimmenden Kräfte gelten kann, läßt sich einer einzelnen Membranseite die Druckdifferenz

$$\Delta f = 2f \frac{d}{D} \quad (50)$$

zuordnen. Mit $d = 63 \text{ \AA}$ und $D = 2 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$ ergibt sich die Geschwindigkeit des Wasserstroms zu

$$v = 2 \cdot 10^{-10} \text{ cm s}^{-1} \quad (51)$$

Die Zeit, die benötigt wird, um sämtliche Membranabstände z.B. um $1 \text{ \AA}$ (als die Hälfte der charakteristischen Länge der Hydrationskräfte) zu vergrößern, sollte sich dann nach

$$t = \frac{1\text{\AA}}{v} \frac{D}{2d} \quad (52)$$

abschätzen lassen. Einsetzen der obigen Daten ergibt den Wert $t \approx 22 \text{ h}$. Wenn der Abstandsunterschied zwischen den Membranen der geordneten L_α -Phase und denen des Randes gerade $1 \text{ \AA}$ beträgt, sollte sich in dieser Zeit die Länge eines vorgegebenen Randbereichs gerade verdoppeln. Dieses Ergebnis ist gut ver-

einbar mit den experimentellen Beobachtungen der Längenausdehnung von normalen und inversen Äquidistanzstrukturen zum Zeitpunkt des Übergangs der Quellentwicklung in den quasistatischen Zustand.

VI.3 Faltung des Randes und Bildung von Äquidistanzstrukturen

Die bei Quellbeginn einsetzenden Ein- bzw. Ausstülpungen des Randes der L_{α} -Phase stellen zwei verschiedene Mechanismen dar, die demonstrieren, auf welche Weise das geordnete Vielschichtsystem seinen Randbereich erweitert. Die den beiden Mechanismen zugrunde liegende Ausbildung der charakteristischen 'normalen' und 'inversen' Äquidistanzstrukturen deutet darüber hinaus darauf hin, daß parallel sich gegenüberliegende (halbzyklindrische) Ränder bestrebt sind, den sie voneinander trennenden Wasserraum zu schließen. Dieses Verhalten kann auf eine anziehende van der Waals-Wechselwirkung zurückgeführt werden. Nach Langbein /LAN74/ läßt sich die zwischen Zylindern mit dem Radius R und der Länge L herrschende Wechselwirkung durch

$$W = - C^* \left(\frac{\pi}{2} \right) R^{1/2} \frac{L}{d_0^{1/2}}, \quad C^* = \frac{C(d_w)}{2} \quad (53)$$

ausdrücken, wobei d_0 den Abstand der Zylinder angibt. Die Konstante C^* läßt sich aus der oberen Grenze des Vorfaktors der Gl. (37) entnehmen und beträgt $C^* = 1 \cdot 10^{-15}$ erg. Mit $r = 10 \mu m$ und $d_0 = 27.5 \text{ \AA}$ erhält man für Zylindersegmente der Länge $L = 2R$ die Wechselwirkungsenergie

$$W = - 7 \cdot 10^{-10} \text{ erg}$$

Diese Abschätzung läßt unberücksichtigt, daß es sich bei den Äquidistanzstrukturen um Lecithin-Wasser-Vielschichtsysteme handelt und nicht um reine Lecithinränder. Die mikroskopischen Beobachtungen bestätigen - in Übereinstimmung mit den theoretischen Überlegungen /HEL78/ - daß die Undulationen im kompakten Vielschichtzylindern aufgrund gegenseitiger Behinderung sehr viel schwächer als im Fall einzelner Membranen sind. Da außerdem $|W| \gg kT$, sollte erwartungsgemäß (und unabhängig vom exakten Wert für d_0) eine Kohäsion zwischen den halbzyklindrischen (bzw. zylindrischen) Rändern erfolgen. Die beschriebene Ausprägung der Äquidistanzmuster wären dann konsequenterweise das sichtbare Ergebnis dieser Kohäsion. Es bleibt allerdings

offen, ob diese Vorstellung noch zuverlässig auf die stark verbreiterten Äquidistanzstrukturen mit ellipitschem Querschnitt angewendet werden kann. Immerhin sollten die maximalen Membranabstände dieser Strukturen das zwei- bis dreifache des Membranabstands der L_{α} -Phase betragen. Möglicherweise reduziert sich bei Abständen dieser Größenordnung ($d_w \approx 500 - 700 \text{ \AA}$) die Wechselwirkung der Randbereiche ausschließlich auf die zwischen den beiden äußersten Membranen der sich gegenüberliegenden Ränder.

Die zur Zylinderbildung führende Faltung des Randes kann nicht durch eine van der Waals-Anziehung erklärt werden, da sich die zwei durch einen Zylinder voneinander getrennten Wasserräume nicht in einem hinreichend ausgedehnten Kontakt miteinander befinden. Vermutlich sind Zylinder energetisch begünstigt, weil durch den Vorgang ihrer Entstehung die Wasserkerne der beiden an der Faltung beteiligten halbzyklindrischen Ränder vereinigt werden, was eine Vergrößerung des Kernradius zur Folge hat. Die Bildung und Ausdehnung eines derartigen Wasserkerns wäre für die Randkonfiguration von Vorteil, da hierdurch eine Gelegenheit zur "Entspannung" der Membranen mit der größten Krümmung gegeben ist.

Die im späteren Quellstadium erfolgende Teilung der Zylinder in halbzyklindrische Randbereiche und die mit diesem "Entfaltungsvorgang" verbundene Bildung der sekundären (planaren) L_{α} -Phase ist schwieriger zu deuten. Es wäre jedoch möglich, daß durch die Aufspaltung von stark vergrößerten Wasserkernlinien eine Druckminderung im umgebenden Bereich des Vielschichtsystems bewirkt wird. Selbst wenn dies zuträfe, bleibt weiterhin unklar, nach welchen Mechanismen die planare Reorientierung der Membranen, die zur sekundären L_{α} -Phase führt, stattfindet. Mit den in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Methoden konnten hierüber bislang keine weiteren Aufschlüsse erzielt werden. Es ist nicht auszuschließen, daß derartige Umbildungsprozesse unter maßgeblicher Beteiligung von Defekten ablaufen, die lichtmikroskopisch nur sehr schwer oder überhaupt nicht zu detektieren sind /HEL81, KLE83/.

VI.4 Analyse der Vesikelentstehung

Der im Verlauf der Quellentwicklung speziell an geordneten Vielschichtsystemen beobachtbare Vorgang der Vesikelbildung kann als ein interessantes (und unerwartetes) 'Nebenprodukt' der beschriebenen Experimente angesehen werden. In Kap. V.3.5 wurden die einzelnen, diesen Vorgang kennzeichnenden Entwicklungsstufen dargestellt. Danach stellt die Ausformung der dünnwandigen Membranröhrchen eine Vorstufe der Vesikelentstehung dar. Die Tatsache, daß die Längenzunahme der Membranzylinder äußerst langsam verläuft, erlaubt es, diesen speziellen Prozeß der Materialabsonderung vom Vielschichtsystem als quasi-statisch zu betrachten und damit einer einfachen quantitativen Behandlung zu unterziehen.

Das Herausdrängen von Membranen aus dem Vielschichtsystem erscheint plausibel, wenn man annimmt, daß dadurch dem zwischen den Membranen der L_{α} -Phase herrschende Druck nachgegeben werden kann. Interessanterweise sind die Radien der Zylinder sämtlich identisch, sofern die Zylinder demselben Randbereich angehören (siehe z.B. Abb. 29). Dieser Befund und die Zunahme des Radius mit abnehmender Lecithindichte führten zu der Annahme, daß zwischen den Radien der Zylinder und dem Druck f der Membranen eine Beziehung bestehen sollte.

Die Größe des Zylinderradius ergibt sich aus zwei miteinander konkurrierenden Mechanismen: Je kleiner der Radius, desto mehr Material kann die L_{α} -Phase abgeben; dem entgegen steht der Aufwand an krümmungselastischer Energie, der sich gerade durch größere Radien verringern läßt.

Nach Gl. (4) wird die elastische Energie G_z eines unilamellaren Zylinders der Länge L mit Radius r und der Fläche A ausgedrückt durch

$$G_z = \frac{1}{2} \kappa \frac{1}{r^2} A \quad (54)$$

Die Fläche A ist gegeben durch

$$A = 2 \pi r L$$

und da das vom Zylinder umschlossene Wasservolumen als quasi-konstant betrachtet werden kann, gilt

$$V = \pi r^2 L = \text{const}$$

Indem A durch L und L durch V ersetzt wird, erhält man so

$$G_z = \frac{\pi V}{r^3} \quad (55)$$

Die durch Herauspressen einer (unilamellaren) Membranfläche freigesetzte Energie kann durch die Beziehung

$$G_f = - f \cdot A \cdot d = - f \frac{2V}{r} d \quad (56)$$

beschrieben werden, wobei d wieder die Membranperiode des Vielschichtsystems angibt. Aus den beiden letzten Beziehungen läßt sich mit Hilfe der Variationsrechnung der Radius r_0 aus dem Minimum der totalen freien Energie bestimmen:

$$\frac{d(G_z + G_f)}{dr} = 0 \quad (57)$$

Die Rechnung liefert die Beziehung

$$\frac{3}{2} \kappa \frac{1}{r_0^2} = f d \quad (58)$$

Dieser Ausdruck enthält ein überraschendes Resultat: Danach ist es möglich, den Druck f allein durch Messung des Radius der Membranröhrchen zu bestimmen, wenn der krümmungselastische Modul κ und die Membranperiode d des Vielschichtsystems bekannt sind. Obige Gleichung soll hier zur Prüfung der Selbstkonsistenz verwendet werden. Für die Membranperiode wird der größte gemessene Abstand aus Tabelle II mit $d = 176 \text{ \AA}$ eingesetzt. Bei diesem Abstand ist mit Sicherheit eine Schwächung der van der Waals-Kräfte eingetreten, da deren Vorfaktor $C(d_w)$

bereits auf $C(d_w = 142 \text{ \AA}) \approx 1.3 \cdot 10^{-15} \text{ erg}$ abgesunken ist /NIN70/. Es soll daher angenommen werden, daß die Membranen bei einem effektiven Abstand $d_{\text{eff}} = d_w - 27.5 \text{ \AA} = 115 \text{ \AA}$ ausschließlich über Undulationen miteinander wechselwirken. Wenn der zwischen den Membranen der L_α -Phase herrschende Druck f allein durch die Undulationskräfte bedingt wird, kann f aus Gl. (58) durch f_{und} aus Gl. (12) ausgedrückt werden. Auflösung nach dem Quadrat des Radius ergibt

$$r_o^2 = \frac{3}{4} \frac{\kappa d_{\text{eff}}^3}{(kT)^2 d} \quad (59)$$

Einsetzen der oben aufgeführten Daten für d und d_{eff} liefert schließlich den Wert

$$r_o = 0.4 \text{ \mu m} .$$

In der nachfolgenden Graphik ist r_o als Funktion des Membranabstands d_w dargestellt. Die den experimentellen Beobachtungen entnommenen Angaben über die Größenverteilung der während der relevanten Quellstadien II und III entstehenden Zylinder lassen sich sehr gut in dieses Bild einordnen. Als konkretes Beispiel sei Abb. 29 angeführt: Der mittlere Radius dieser Zylinder beträgt $r_o = 0.7 \text{ \mu m} \pm 15 \%$; die Zylinder entstammen einem Bereich der L_α -Phase, dessen Lecithindichte zwischen 14 und 18 vol.% variierte. Dies entspricht einer mittleren Periode $d = 222 \text{ \AA}$, woraus sich nach Gl. (59) mit $d_{\text{eff}} = 159 \text{ \AA}$ der Radius $r_o = 0.6 \text{ \mu m} \pm 10 \%$ ergibt. Erst weitere Experimente werden zeigen können, ob diese sehr gute Übereinstimmung mehr ist als ein glücklicher Zufall. Wegen der möglichen Beteiligung elektrostatischer Kräfte muß man auch das Meßergebnis mit Vorsicht betrachten.

Aus dem oben Dargestellten ergibt sich nunmehr auch die Möglichkeit, eine Entscheidung über den Einfluß eventuell vorhandener elektrostatischer Kräfte zu treffen. Nach Gl. (58) läßt

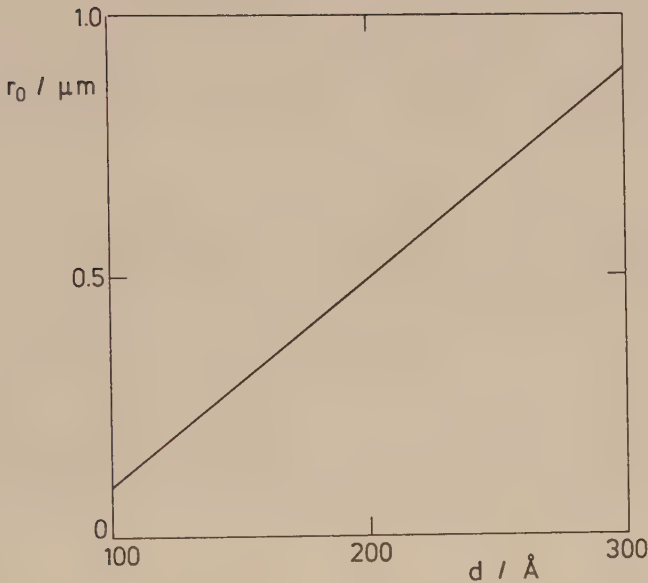


Abb. 34: Darstellung des Zylinderradius r_0 als Funktion der Membranperiode d

sich der Druck f für $d = 176 \text{ Å}$ und $r_0 = 0.4 \text{ μm}$ zu $f \approx 1 \cdot 10^3 \text{ dyn cm}^{-2}$ bestimmen. Wenn dieser Druck aufgrund einer elektrostatischen Abstoßung zustande käme, ließe sich nach Gl. (41) die entsprechende Molfraktion mit $X(d_w = 142 \text{ Å}) \approx 10^{-4}$ angeben. Der graphischen Darstellung in Abb. 32 kann entnommen werden, daß $X(d_w = 142 \text{ Å}) \ll X_{\text{ÜB}}(d_w = 142 \text{ Å})$. Daraus ist zu folgern, daß für alle beobachteten Abstände jeweils $f_{\text{es}} \sim d_w^{-1}$ gelten muß. Wegen dieser relativ schwachen Abhängigkeit von d_w können daher elektrostatische Kräfte insbesondere für kleinere Abstände vernachlässigt werden. Die Extrapolation von f_{es} ($X = 10^{-4}$) auf $d_w = 27.5 \text{ Å}$ (siehe Abb. 32) liefert den Wert $f_{\text{es}} \approx 5 \cdot 10^3 \text{ dyn cm}^{-2}$, der damit um einige Größenordnungen niedriger liegt als die diesem Abstand entsprechenden Werte für $|f_{\text{vdw}}|$ und f_{und} . Das bedeutet aber, daß die elektrostatischen Kräfte - falls vorhanden - nicht in die Konkurrenz der beiden

anderen Wechselwirkungen entscheidend eingreifen könnten, jedenfalls nicht in der Nähe des sogenannten Gleichgewichtsabstands. Aus sehr genauen Messungen von f als Funktion von d müßte sich jedoch feststellen lassen, ob mit einem elektrostatischen Beitrag zumindest bei größeren Abständen zu rechnen ist.

Abschließend sei noch bemerkt, daß die Radien der Membranröhrchen nicht von deren Lamellenzahl abhängen sollte. Wenn die Bildung derartiger Zylinder unter Beteiligung von mehr als einer Membran erfolgt, müssen die Energien in den Ausdrücken der Gln. (55) und (56) der Lamellenzahl entsprechend vervielfacht werden, was sich jedoch in der Endformel für r_0 wieder heraushebt. Die experimentellen Ergebnisse stimmen mit dieser Aussage überein und das kann als eine zusätzliche Bestätigung der in diesem Kapitel aufgeführten Betrachtungen gewertet werden.

VII. Zusammenfassung

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen an einigen der durch den Quellprozeß von EL in Wasserüberschuß entstehen- den Membranstrukturen wurden mit Hilfe verschiedener lichtmi- kroskopischer Methoden ausgeführt. Neben den üblichen Methoden wurde ein für derartige Zwecke bisher nicht verwendetes Grenz- flächeninterferenzverfahren mit Videokontrastverstärkung be- nutzt, das Aufschlüsse über das Fluktuations- bzw. Kontaktver- halten von planaren Membranen respektive Vesikeln bei deren Berührung mit Glas (oder anderen Oberflächen) gibt. - Die Ex- perimente wurden an Vesikeln, ungeordneten und wohlgeordneten Lecithin-Wasser-Systemen vorgenommen.

Freie Vesikeln konnten im elektrischen Feld orientiert, an ihren Enden geöffnet und zu Zylindern deformiert werden. Aus den Parametern der Zylinder konnte die Randenergie γ der EL- Doppelschicht bestimmt werden. Es ergab sich für unilamellare Membranen der Wert $\gamma = 2 \cdot 10^{-6}$ erg cm $^{-1}$.

Quellversuche an ungeordneten EL-Wasser-Schichten lieferten eindeutige Hinweise auf die Existenz spezifischer Membranver- bindungen, sogenannter Passagen. Die Interpretation derartiger Strukturen zeigt, daß die minimale elastische Energie einer Passage durch $E_p = -4\pi \bar{\kappa}$ gegeben ist. die Entstehung von Pas- sagen(gittern) ist danach ein energetisch begünstigter Vorgang und ein Anzeichen, daß die Membranen des EL - zumindest in einem gewissen Wasserkonzentrationsbereich - die Tendenz zur Fusion aufweisen. Aufgrund dieser Beobachtungen darf vermutet werden, daß das Vorzeichen des elastischen Moduls der Gauß'schen Krümmung $\bar{\kappa}$ positiv ist.

Durch Herstellung geeigneter experimenteller Voraussetzungen war es möglich, die einzelnen (bis dahin weitgehend unbekann- ten) Stufen der Quellentwicklung von geordneten Vielschichtsy- stemen reproduzierbar zu verfolgen. Auf die zu Quellbeginn sich bildenden 'normalen' und 'inversen' Äquidistanzstrukturen folgen weitere Quellstadien, die von einer stetigen Zunahme

des Membranabstands (hier bis zu $d_w \approx 200 \text{ \AA}$) begleitet sind. Sämtliche an diesen Systemen durch Messung und Beobachtung gewonnenen Ergebnisse sprechen gegen die Existenz eines Gleichgewichtsabstands oder einer Phasenscheidung. Dieser Umstand kann nur so gedeutet werden, daß die Hydrations- und die Undulationskräfte gegenüber der zwischen den Membranen herrschenden van der Waals-Anziehung überwiegen und damit einen Quellprozeß in Gang setzen, der mindestens bis zu den maximalen hier gefundenen Membranabständen ($\approx 200 \text{ \AA}$) wirksam ist. Diese Tatsache steht in krassem Widerspruch zu den an ungeordneten Lecithin-Wasser-Dispersionen ausgeführten Röntgenmessungen /RAN81/, die scheinbar ein stabiles Phasengleichgewicht bei $d_w = 27.5 \text{ \AA}$ feststellen. Es wurde darauf hingewiesen, daß dieser Widerspruch erklärlich wird, wenn man annimmt, daß die Membranstrukturen von Lecithin-Wasser-Dispersionen so klein sind, daß die Amplitude der Undulationen stark beschränkt wird. Die in den Abbildungen 31a,b dieser Arbeit gezeigten Membranzylinder geben mit ihrem Kohäsionsverhalten ein Beispiel dafür, daß "kleine" Strukturen haften, während sich "große" lösen. (Dort ist die entscheidende Länge der Zylinder-radius).

Ein weiteres wichtiges Resultat der vorliegenden Arbeit ist die Aufdeckung einer Möglichkeit, den Druck zwischen den Membranen in einem Vielschichtsystem quantitativ zu bestimmen. Sie beruht auf einer Beziehung zwischen diesem Druck und den Radien von Membranzylindern, die vom Rand des Vielschichtsystems in die freie wässrige Phase 'wachsen'. Eine erste Messung bei $d_w \approx 200 \text{ \AA}$ zeigt, daß der aus den Radien berechnete Druck sehr gut mit dem theoretischen Wert der abstoßenden Undulationskräfte übereinstimmt. Mit derselben Analyse konnte nachgewiesen werden, daß ein wesentlicher Einfluß der eventuell vorhandenen elektrostatischen Kräfte auf den Quellvorgang auszuschließen ist. Es sollte möglich sein, durch Messungen über größere Abstandsbereiche eine exakte Bestimmung der Undulationskräfte vorzunehmen.

Es wurde beobachtet, daß die Absonderung der Membranzylinder als Vorstufe eines speziellen Mechanismus der Vesikelbildung unter Beteiligung mobiler Defektlinien erfolgt. Der Ursprung dieser für den Vorgang anscheinend essentiellen Membranränder bleibt unklar. Jedoch ist zu vermuten, daß zwischen ihnen und den für den gesamten Quellverlauf ebenso essentiellen smekti-schen Dislokationen der L_{α} -Phase ein ursächlicher Zusammenhang besteht.

Die Reproduzierbarkeit der in dieser Arbeit beschriebenen relevanten Quellphänomene erfordert als Ausgangssystem ein wohlgeordnetes Vielschichtsystem, das die gesamte Probenhöhe ausfüllt. Nur unter diesen Bedingungen war es z.B. möglich, die durch Wasserentzug induzierten periodischen Deformationen der Äquidistanzmuster als Strukturen zu identifizieren, deren Charakteristika mit jenen der 'ölige Streifen' genannten Defekte in auffälliger Weise übereinstimmen.

Literaturverzeichnis

- | | | |
|---------|---|---|
| /ASH79/ | S.A. Asher
P.S. Pershan | Biophys. J. <u>27</u> (1979) 393 |
| /BAN65/ | A.D. Bangham
M.M. Standish
J.C. Watkins | J. Mol. Biol. <u>13</u> (1965)
238 |
| /BAN72/ | A.D. Bangham | Ann. Rev. Biochemistry
(1972) 753 |
| /BAN80/ | A.D. Bangham | in "Liposomes in Biological
Systems", New York 1980 |
| /BEY65/ | H. Beyer | "Theorie und Praxis des
Phasenkontrastverfahrens",
Frankfurt 1965 |
| /BOR81/ | E. Boroske
M. Elwenspoek
W. Helfrich | Biophys. J. <u>34</u> (1975) 1035 |
| /BRO75/ | F. Brochard
J.F. Lennon | J. Physique <u>36</u> (1975) 1035 |
| /BOU78/ | Y. Bouligand | in "Solid State Physics"
<u>14</u> (1978) 259 |
| /CHA78/ | J. Charvolin
A. Tardieu | in "Solid State Physics"
<u>14</u> (1978) 209 |
| /CHA81/ | W.K. Chan
W.W. Webb | Phys. Rev. Lett. <u>46</u> (1981)
603 |
| /COW78/ | A.C. Cowley
N.L. Fuller
R.P. Rand
V.A. Parsegian | Am. Chem. Soc. <u>17</u> (1978)
3163 |
| /DEU76/ | H.J. Deuling
W. Helfrich | Blood Cells <u>3</u> (1977) 713 |
| /EVA83/ | E. Evans
B. Kukan | Biophys. J. <u>44</u> (1983) 255 |
| /FET78/ | R. Fettiplace | Biochim. Biophys. Acta <u>513</u>
(1978) 1 |
| /FON81/ | K. Fontell | Mol. Cryst. Liq. Cryst. <u>63</u>
(1981) 59 |
| /FRE53/ | A. Frey-Wyssling | "Submicroscopic Morphology
of Protoplasm", Elsevier,
Amsterdam 1953 |

/GEN75/	P.G. deGennes	"The Physics of Liquid Crystals", Oxford 1975
/GUL69/	T. Gulik-Krzywicki A. Tardieu V. Luzzatti	Mol. Cryst. Liq. Cryst. <u>8</u> (1969) 285
/HAR76/	W. Harbich R.M. Servuß W. Helfrich	Phys. Lett. <u>57A</u> (1976) 294
/HAR77/	W. Harbich H.J. Deuling W. Helfrich	J. Physique <u>38</u> (1977) 727
/HAR78/	W. Harbich R.M. Servuß W. Helfrich	Z. Naturforsch. <u>33a</u> (1978) 1013
/HAR79/	W. Harbich W. Helfrich	Z. Naturforsch. <u>34a</u> (1979) 1063
/HAR84/	W. Harbich W. Helfrich	wird veröffentlicht in Chem. Phys. Lipids
/HEL73/	W. Helfrich	Z. Naturforsch. <u>28c</u> (1973) 693
/HEL74a/	W. Helfrich	Z. Naturforsch. <u>29c</u> (1974) 510
/HEL74b/	W. Helfrich	Phys. Lett. <u>50A</u> (1974) 115
/HEL74c/	W. Helfrich	Z. Naturforsch. <u>29c</u> (1974) 182
/HEL75/	W. Helfrich	Z. Naturforsch. <u>30c</u> (1975) 841
/HEL78/	W. Helfrich	Z. Naturforsch. <u>33a</u> (1978) 305
/HEL81/	W. Helfrich	Les Houches, Session XXXV, 1980 - Physics of Defects, North Holland Publishing Company, 1981
/HEL84a/	W. Helfrich R.M. Servuß	Nuovo Cimento <u>3D</u> (1984) 137
/HEL84b/	W. Helfrich W. Harbich	wird veröffentlicht in Chemica Scripta
/HEN81/	M. Hentschel	Dissertation, Berlin 1981
/HUA69/	C. Huang	Biochemistry <u>8</u> (1969) 344

- /HUI81/ S.W. Hui Nature 290 (1981) 427
T.P. Stewart
- /JUN69/ E. Junger Biochim. Biophys. Acta 183
H. Reinauer (1969) 304
- /KLE76/ M. Kléman Phil. Magn. 35 (1977) 33
C.E. Williams
M.J. Costello
T. Gulik-Krzywicki
- /KLE83/ W. Kléman "Points, Lines and Walls",
J. Wiley and Sons, 1983
- /LAN74/ D. Langbein "Springer Tracts in Modern
Physics", Vol. 22, Sprin-
ger Verlag 1974
- /LEH11/ O. Lehmann "Die neue Welt der Flüssi-
gen Kristalle", Akad. Ver-
lagsanstalt, Leipzig, 1911
- /MAR76/ S. Marcelja Chem. Phys. Lett. 42
N. Radic (1976) 129
- /LIS82/ L.J. Lis Biophys., J. 37 (1982) 657
M. McAlister
N. Fuller
R.P. Rand
V.A. Parsegian
- /LOO82/ M.E. Looseley-Millmann Biophys. J. 40 (1982) 221
R.P. Rand
V.A. Parsegian
- /NEV76/ D.M. LeNeveu Nature 259 (1976) 601
R.P. Rand
V.A. Parsegian
- /NEV77/ D.M. LeNeveu Biophys. J. 18 (1977) 209
R.P. Rand
V.A. Parsegian
D. Gingell
- /NIN70/ B.W. Ninham J. Chem. Phys. 53 (1970)
V.A. Parsegian 3398
- /NIR76/ S. Nir J. Membrane Biol. 31
M. Andersen (1977) 1
- /MUE83/ P. Mueller Biophys. J. 44 (1983) 375
T.F. Chien
- /PAP67/ D. Papahadjopoulos Biochim. Biophys. Acta 135
N. Miller (1967) 624

/PAP73/	D. Papahadjopoulos	in "Form and Functions of Phospholipids", Elsevier, Amsterdam 1973
/PAR79/	V.A. Parsegian N. Fuller R.P. Rand	Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>76</u> (1979) 2750
/PET78/	P.G. Petrov M.D. Mitov A. Derzhanski	Phys. Lett. <u>65A</u> (1978) 374
/POW77/	L. Powers N.A. Clark	Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>72</u> (1975) 840
/POW77/	L. Powers P.S. Pershan	Biophys. J. <u>20</u> (1977) 137
/RAN81/	R.P. Rand	Ann. Rev. Biophys. Bioeng. <u>10</u> (1981) 277
/RAU76/	J. Rault	Phil. Mag. <u>34</u> (1976) 753
/REE68/	J.P. Reeves R.M. Dowben	J. Cell. Physiol. <u>73</u> (1968) 49
/REI1888/	F. Reinitzer	Monatsh. <u>9</u> (1888) 421
/SAK83/	I. Sakurai Y. Kawamura	Biochim. Biophys. Acta <u>735</u> (1983) 189
/SAU77/	A. Saupe	J. Coll. Interface Sci. <u>58</u> (1977) 549
/SCH65/	G. Schwarz M. Saito H.P. Schwan	J. Chem. Phys. <u>43</u> (1965) 3562
/SCH84/	M.B. Schneider W.W. Webb	J. Physique <u>45</u> (1984) 273
/SER76/	R.M. Servuś W. Harbich W. Helfrich	Biochim. Biophys. Acta <u>436</u> (1976) 900
/SER80/	R.M. Servuś E. Boroske	Chem. Phys. Lipids <u>27</u> (1980) 57
/SER84/	R.M. Servuś	Dissertation, Berlin 1984
/SMA66/	D.M. Small M.C. Bourguès G.D. Dervichian	Biochim. Biophys. Acta <u>125</u> (1966) 563
/SMA67/	D.M. Small	J. Lipid Res. <u>8</u> (1967) 551

- /SOR84/ D. Sornette J. Physique 45 (1984) 265
N. Ostrowski
- /STE74/ G.T. Stewart in "Liquid Crystals and
Plastic Crystals", Vol. 1,
John Wiley and Sons, New
York 1974
- /SZO80/ F. Szoka Ann. Rev. Biophys. Bioeng.
D. Papahadjopoulos 9 (1980) 467
- /TAN80/ C. Tanford "The Hydrophobic Effect",
2nd ed., New York 1980
- /TAU75/ C. Taupin Biochemistry 14 (1975)
M. Dvolaitzky 4771
C. Sauterey
- /TIE74/ H.T. Tien "Bilayer Lipid Membranes",
New York 1974
- /VIR1854/ R. Virchow Virchows Archiv 6 (1854)
571
- /ZIM80/ U. Zimmermann Bioelectrochem. Bioenerg.
J. Vienken 7 (1980) 553
G. Pilwat
- /ZIM82/ U. Zimmermann J. Membrane Biol. 67
J. Vienken (1982) 165

Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe Biophysik am Institut für Atom- und Festkörperphysik (WE 1B) der Freien Universität Berlin durchgeführt und von Herrn Prof. Dr. W. Helfrich betreut.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. W. Helfrich für die Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen, die dazu beigetragen haben, daß viele der während der Durchführung dieser Arbeit entstandenen Probleme gelöst werden konnten.

Herrn Dr. R.M. Servuß danke ich für den wichtigen Erfahrungsaustausch auf dem Gebiet der lichtmikroskopischen Untersuchungen von Lecithin-Wasser-Systemen.

Den ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biophysik, Herrn Dr. E. Boroske und Herrn Dr. M. Hentschel danke ich für ihre interessanten und oft anregenden Diskussionsbeiträge.

Wolfram Harbich

Lebenslauf

12.07.1945	geboren in Helmstedt als Sohn des Sattlers Karl Harbich und seiner Ehefrau Irmtraud, geb. Jondral
1952 - 1956	Besuch der Volksschule in Esbeck/Krs. Helmstedt
1956 - 1963	Besuch der Realschule in Schöningen mit Abschluß der mittleren Reife
1963 - 1965	Ausbildung an der Physikalisch-Technischen Lehranstalt in Wedel/Holst.
1966 - 1969	Besuch der Berliner Abendgymnasien Stachowiak und Silbermann mit Abschluß Abitur
ab 1969	Studium der Physik an der Freien Universität Berlin
1972	Vordiplom
1974 - 1977	Anfertigung einer Diplomarbeit am Institut für Atom- und Festkörperphysik unter Betreuung von Prof. Dr. W. Helfrich
Juni 1977	Diplomprüfung
1977 - 1984	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fachbereich Physik

